

UNIVERSITÉ DE PARIS

FACULTÉ DE PHARMACIE

Année scolaire 1957-1958

Série U. N° 295

**CONTRIBUTION A L'ÉTUDE
CHIMIQUE ET PHARMACOLOGIQUE
DE LA RÉGLISSE
(*Glycyrrhiza glabra* L.)**

THÈSE

POUR L'OBTENTION DU DIPLÔME DE

**Docteur de l'Université de Paris
(PHARMACIE)**

Présentée et soutenue le 11 juillet 1958

PAR

Micheline POINTET-GUILLOT

Pharmacien

JURY { MM. R. PARIS, *Président* ;
A. QUEVAUVILLER, *Professeur* ;
G. DILLEMANN, *Maître de Conférences*.

PARIS
JOUVE, ÉDITEUR

15, rue Racine, 15

1958

FACULTÉ DE PHARMACIE DE PARIS

Nom du Candidat : POINTET-GUILLOT Micheline

Date de la soutenance : Juillet 1958

Numéro d'ordre : Série U N° 295

1

POINTET-GUILLOT (Micheline).

— Contribution à l'étude chimique et pharmacologique de la Réglisse (*Glycyrrhiza glabra* L.).
— Paris, 1958, Jouve, éditeurs, 146 pages.

Th. Doct. Univ. Pharm. Paris, 1958
N° 295.

2

POINTET-GUILLOT (Micheline).

— Contribution à l'étude chimique et pharmacologique de la Réglisse (*Glycyrrhiza glabra* L.).
— Paris, 1958, Jouve, éditeurs, 146 pages.

Th. Doct. Univ. Pharm. Paris, 1958
N° 295.

3

POINTET-GUILLOT (Micheline).

— Contribution à l'étude chimique et pharmacologique de la Réglisse (*Glycyrrhiza glabra* L.).
— Paris, 1958, Jouve, éditeurs, 146 pages.

Th. Doct. Univ. Pharm. Paris, 1958
N° 295.

4

POINTET-GUILLOT (Micheline).

— Contribution à l'étude chimique et pharmacologique de la Réglisse (*Glycyrrhiza glabra* L.).
— Paris, 1958, Jouve, éditeurs, 146 pages.

Th. Doct. Univ. Pharm. Paris, 1958
N° 295.

Digitized by the Internet Archive
in 2026



UNIVERSITÉ DE PARIS

FACULTÉ DE PHARMACIE

Année scolaire 1957-1958

Série U. N° 295

CONTRIBUTION A L'ÉTUDE
CHIMIQUE ET PHARMACOLOGIQUE
DE LA RÉGLISSE
(*Glycyrrhiza glabra* L.)

THÈSE

POUR L'OBTENTION DU DIPLÔME DE

Docteur de l'Université de Paris
(PHARMACIE)

Présentée et soutenue le 11 juillet 1958

PAR

Micheline POINTET-GUILLOT

Pharmacien



JURY { MM. R. PARIS, *Président* ;
A. QUEVAUVILLER, *Professeur* ;
G. DILLEMANN, *Maître de Conférences*.

PARIS
JOUVE, ÉDITEUR

15, rue Racine, 15

1958

PERSONNEL DE LA FACULTÉ DE PHARMACIE DE PARIS

ADMINISTRATION

MM. RENÉ FABRE, *Doyen*, C. ✱, C. ☉ Membre de l'Institut.
 R. DELABY, *Assesseur*, O. ✱, C. ☉ G. CUVIER, *Secrétaire Général*, ✱, ☉ I.
 MM. JEANDEL, *Secrétaire*, ☉ I., QUILLIOT, *Rédacteur*.
 M^{me} ESPINASSE, *Rédactrice*, I. ✱, M^{me} DENNY, *Rédactrice*, M^{me} BERIL, *Rédactrice*.
 M^{me} CELLIER, *Commis*, ☉ A., M^{me} MORIN, *Commis*, ☉ A., M^{me} CARON, *Commis*.

PROFESSEURS

MM. FABRE, Membre de l'Institut, C. ✱, ☉ C.	Toxicologie.
DELABY, O. ✱, C. ☉	Pharmacie chimique.
JANOT, ✱, ☉ I.	Pharmacie galénique.
VALETTE, ✱, ☉ I.	Pharmacodynamie.
BEDEL, ✱, ☉ I.	Législation, Déontologie et Histoire de la Pharmacie.
PARIS, ✱, ☉ I.	Histoire naturelle des Médicaments simples d'origine végétale.
GUILLLOT, ✱, ☉ I.	Physique.
GAUTIER, ✱, ☉ I.	Chimie organique.
M ^{me} LAMBIN, ✱, ☉ I.	Microbiologie.
MM. RAOUL, ☉ I.	Zoologie appliquée.
COURTOIS, ✱, ☉ I.	Chimie biologique.
DOMANGE, ✱, ☉ I.	Chimie minérale.
CRÉTÉ, ✱, ☉ I.	Botanique.
QUEVAUVILLER, ☉ I.	Hygiène.
MORETTE, ✱, ☉ I.	Hydrologie.
MOREAU, ✱, ☉ I.	Chimie analytique.
TRUHAUT, ✱, ☉ I.	Professeur à titre personnel.
CAVIER, ☉ I.	Professeur à titre personnel.
GUY, ☉ A.	Professeur à titre personnel.
GERMAN, ☉ A.	Professeur sans chaire.
PIETTE, ☉ I.	Professeur sans chaire.

Doyen Honoraire : M. RADAIS, C. ✱, ☉ I

Professeurs Honoraires :

MM. DELÉPINE, C. ✱, ☉ I. et LEBEAU, C. ✱, ☉ I. Membres de l'Institut.
 HÉRISSEY, C. ✱, ☉ I. LAUNOY, C. ✱, ☉ I. FLEURY, O. ✱, ☉ I.
 MASCRÉ, O. ✱, ☉ I., PICON, O. ✱, ☉ I.

MAÎTRES DE CONFÉRENCES

MM. DAMIENS	Sciences physiques et chimiques.
DEYSSON, ☉ A.	Sciences naturelles.
MALANGEAU, ☉ A.	Sciences appliquées.
FLAHAUT	Sciences physiques et chimiques.
RENAULT, J.	Sciences physiques et chimiques.
N.	Sciences naturelles.
N.	Sciences naturelles.
N.	Sciences physiques et chimiques.
N.	Sciences physiques et chimiques.

CHEFS DE TRAVAUX PRATIQUES

MM. BORY	Sérologie.
BOURDON	Chimie analytique (1 ^{re} Année).
CORRIEZ ☉ I.	Physique.
DESVIGNES	Microbiologie.
HARISPE, ☉ I.	Chimie générale et pharmaceutique.
LECLERC	Chimie biologique.
M ^{me} LONGUEVALLE, ☉ I.	Service des Examens de chimie.
MM. MANGEOT, ☉ A.	Chimie (4 ^e année).
PELLERIN	Chimie analytique (2 ^e et 3 ^e années).
RENAULT H, ☉ A.	Chimie analytique (2 ^e et 3 ^e années).
SAVEL	Parasitologie.
M ^{me} ROLLEN ✱, ☉ A.	Biologie végétale.

INSTITUT DE PHARMACOTECHNIE ET DE PHARMACODYNAMIE

MM. GOUTARIEL ☉ A.	Chef de Travaux de Pharmacotechnie galénique.
M ^{me} MORIN, ☉ A.	Chef de Trav. de Pharmacodynamie.
M. LUSINCH	Chef de Trav. de Pharm. chimique.

BIBLIOTHÈQUE

Conservateur : M. GARNIER, ✱, ☉ I

Bibliothécaires : M^{me} LAVAUD, ☉ I., M^{mes} DESGRIPPES, ☉ A., KREHMER, ☉ A.

A MONSIEUR LE PROFESSEUR R. PARIS

Professeur de Matière Médicale à la Faculté de Pharmacie de Paris,
Chevalier de la Légion d'Honneur

*qui nous a fait le grand honneur
de nous confier ce sujet de travail et
de présider le Jury de cette Thèse.*

*Témoignage de profond respect
et de bien sincère reconnaissance.*

A MONSIEUR LE PROFESSEUR A. QUEVAUVILLER

Professeur à la Faculté de Pharmacie de Paris

qui a accepté de juger ce travail.

Témoignage de respectueuse gratitude.

A MONSIEUR G. DILLEMANN

Maître de Conférences,

*qui a bien voulu faire partie de
notre Jury de Thèse.*

*Témoignage de sincère reconnais-
sance.*

A MON MARI

A MON FILS

A MES PARENTS

A TOUTE MA FAMILLE

Témoignage de ma profonde affection

PLAN DU TRAVAIL

INTRODUCTION	Pages 9
--------------------	------------

PREMIÈRE PARTIE

TRAVAUX ANTÉRIEURS

CHAPITRE I. — <i>La Réglisse au point de vue botanique</i>	11
CHAPITRE II. — <i>Composition chimique</i>	16
I. Généralités	16
II. — La glycyrrhizine	17
III. Les dérivés flavoniques	20
IV. Les substances oestrogènes	22
CHAPITRE III. — <i>Action physiologique</i>	25
I. — Historique	25
II. — Propriétés pharmacologiques	26

DEUXIÈME PARTIE

TRAVAUX PERSONNELS

CHAPITRE I. — <i>Essais préliminaires</i>	35
CHAPITRE II. — <i>Etude des flavonoïdes</i>	41
A. — Extraction des dérivés flavoniques totaux	41
I. — A partir de la plante fraîche (procédé CHARAUX-PARIS).....	41
II. — A partir de la plante sèche	45
1. Procédé de SHINODA et UEEDA	46
2. Extraction à chaud dans l'appareil de SOXHLET.....	46
3. Extraction à froid par lixiviation.....	48
4. Procédé de PURI et SESHADRI	50
B. — Fractionnement des flavonoïdes totaux.....	51
I. — Epuisement par différents solvants dans un micro-Kumagawa..	52
II. — Chromatographie d'adsorption sur colonne.....	53
III. — Chromatographie de partage sur colonne de cellulose hydratée..	57
C. — Etude physico-chimique du liquiritoside (flavanone).....	61
I. — Propriétés physiques	61
II. — Analyse élémentaire	64
III. — Propriétés chimiques	64
1. Réactions colorées	64
2. Hydrolyse acide (étude de la génine et des sucres).....	65

D. — Etude physico-chimique de l'iso-liquiritoside (chalcone).....	68
I. Propriétés physiques	68
II. — Analyse élémentaire	71
III. Propriétés chimiques	71
1. Réactions colorées	71
2. Hydrolyse acide (étude de la génine et des sucres).....	72
E. — Etude en chromatographie sur papier des préparations de Réglisse ...	74
F. Dosage des flavonoïdes.....	77
I. Dosage du liquiritoside	77
II. Dosage de l'iso-liquiritoside	83
CHAPITRE III. — <i>Caractérisation et dosage de la glycyrrhizine</i>	85
A. Caractérisation.....	85
B. Dosage	91
I. Méthode de VIRATELLE	93
II. — Méthode de la Pharmacopée Française	95
III. — Méthode de FUCHS	97
IV. Méthode de WIEST	100
CHAPITRE IV. — <i>Etude des substances œstrogènes</i>	105
A. Extraction	105
B. — Séparation par chromatographie sur papier	109
CHAPITRE V. — <i>Etude physiologique</i>	120
A. — Dérivés flavoniques.....	120
I. — Détermination de la toxicité aiguë et chronique	120
II. Activité antispasmodique	121
III. Action sur les ulcères expérimentaux.....	124
IV. — Action sur la perméabilité et la résistance capillaires.....	126
V. — Action sur la pression artérielle	129
B. Œstrogènes	132
CONCLUSIONS GÉNÉRALES.....	135

CONTRIBUTION A L'ÉTUDE CHIMIQUE ET PHARMACOLOGIQUE DE LA RÉGLISSE (*Glycyrrhiza glabra* L.)

INTRODUCTION

Les dernières acquisitions de la phytothérapie proviennent soit de l'introduction d'espèces nouvelles, généralement exotiques, soit de la découverte de nouveaux principes dans des drogues anciennement connues. La Réglisse appartient à cette dernière catégorie. Son usage remonte à l'Antiquité mais alors qu'elle était employée jusqu'à ces dernières années surtout comme édulcorant et expectorant, on lui a découvert de nouvelles propriétés physiologiques :

— un pouvoir œstrogène sensiblement égal à celui de la poudre d'ovaire :

— une action analogue à celle de la cortisone, d'où son emploi dans le traitement de la maladie d'Addison ;

— enfin et surtout une action antispasmodique et anti-ulcère de l'estomac, d'où son utilisation en gastro-entérologie.

Les expérimentateurs ayant travaillé sur des extraits de la drogue, il importait de voir la part respective des différents constituants dans l'activité physiologique de la Réglisse. En dehors du principe sucré, la glycyrrhizine, qui appartient au groupe des saponines, un dérivé flavonique, le liquiritoside, avait été isolé en 1934, mais sans que ses propriétés physiologiques aient été étudiées.

Les flavonoïdes ont pris depuis plusieurs années une réelle importance en thérapeutique. Au Laboratoire de Matière Médicale de la Faculté de Pharmacie de Paris, ils ont déjà fait l'objet, tant au point de vue chimique que physiologique, de nombreuses publications du Professeur PARIS et de ses élèves. C'est donc surtout vers l'étude de ces principes de la Réglisse que nous orienta d'abord notre Maître, le Professeur PARIS.

lorsqu'il nous a accueilli dans son laboratoire en 1954. Ce travail devait comporter, outre l'isolement, la purification et l'étude physico chimique des dérivés flavoniques, divers essais physiologiques afin de préciser le rôle de ces substances dans les différentes activités de la Réglisse, en particulier son action protectrice dans l'ulcère gastrique. Par la suite nos recherches se sont étendues aux dérivés œstrogéniques. Enfin nous avons dû étudier les méthodes de caractérisation et de dosage de la glycyrrhizine qui, en raison de la propriété de donner des ordèmes, doit être éliminée en partie de certaines préparations de Réglisse.

Avant de passer à l'exposé détaillé de nos recherches, nous demandons à Monsieur le Professeur R. PARIS de croire à nos très sincères remerciements pour nous avoir accueilli dans son laboratoire. Sa grande expérience scientifique et sa constante sollicitude nous ont permis non seulement de surmonter les périodes de découragement que provoquent parfois les difficultés de la recherche, mais aussi d'en connaître les joies et de mener à bien ce travail. Qu'il veuille bien trouver ici le témoignage de notre gratitude respectueuse pour le très grand honneur qu'il nous fait en acceptant de présider le Jury de cette Thèse.

Nous exprimons également nos respectueux remerciements à Monsieur le Professeur A. QUEVAUVILLER et à Monsieur G. DILLEMANN, Maître de Conférences, qui ont accepté de juger ce travail.

Nous ne saurions oublier le dévouement et la gentillesse de Madame MOYSE-MIGNON, Assistante de la Chaire de Matière Médicale, dont l'expérience et l'aide constante nous furent si précieuses. Nous lui adressons nos remerciements amicaux.

Nous assurons de notre vive reconnaissance ceux qui, au Laboratoire National de Contrôle des Médicaments et au Laboratoire de Matière médicale, nous ont fréquemment prêté leur concours : Mademoiselle R. BRUN et Mademoiselle D. COIGNARD pour les essais pharmacodynamiques, Madame R. PORTOUX si souvent mise à contribution, et Monsieur A. DANGEARD pour son expérience pratique.

Qu'il nous soit également permis d'exprimer ici notre profonde gratitude à Monsieur C. LAVILLE, Biologiste, qui nous a encouragé à entreprendre ce travail, ainsi qu'à nos associés Madame PRUD'HON, Monsieur RAVANBAZ et Monsieur NEGREVERGNE, Docteur en Pharmacie, pour leur compréhension et leur aide matérielle.

Nous sommes heureuse, enfin, d'exprimer à tous nos camarades de Laboratoire connus au cours de ces quatre années, notre amicale sympathie.

PREMIÈRE PARTIE

TRAVAUX ANTÉRIEURS

CHAPITRE I

LA RÉGLISSE AU POINT DE VUE BOTANIQUE

La Réglisse est décrite dans la Pharmacopée française de 1949 comme étant la racine et le rhizome de *Glycyrrhiza glabra* L. et de *Glycyrrhiza glabra* var. *glandulifera* (Légumineuses-Papilionacées). Les différentes Pharmacopées ont des définitions analogues. Cependant, la Pharmacopée britannique admet, outre *Glycyrrhiza glabra*, « les racines des espèces de *Glycyrrhiza* ayant un goût sucré et très peu d'amertume ». La Pharmacopée russe admet *Glycyrrhiza glabra* var. *glandulifera* et l'espèce *Glycyrrhiza uralensis*.

I. — Le genre *Glycyrrhiza*

Le mot *Glycyrrhiza* résulte de la juxtaposition de deux mots grecs « γλυκὺς » qui signifie doux et « ρίζα » qui signifie racine.

Ce genre fut créé par LINNÉ (86). Il est actuellement classé parmi les Légumineuses-Papilionacées, série des Galégées, sous-série des Astragalées. Il comporte des plantes herbacées vivaces ou des sous-arbrisseaux, à feuilles composées imparipennées, les folioles étant généralement nombreuses, rarement réduites à 3 ou 5. Les fleurs, petites, sont blanches, jaunâtres, bleues ou violacées, disposées en grappes ou en épis axillaires. Le réceptacle est concave, obconique, glanduleux en dedans. Le calice est tubuleux et bilabié ; comme bossu à la base, il s'ouvre au sommet en deux lèvres comportant deux dents à la lèvre supérieure et trois dents à la lèvre inférieure. Les pétales sont libres : la carène, constituée

par deux pétales libres entre eux, est plus courte que les ailes, qui sont elles-mêmes plus courtes que l'étendard. Ce dernier est dressé. Il y a dix étamines dont neuf soudées entre elles par le filet et la dixième libre. Les anthères sont déhiscentes par une fente courbe en forme de fer à cheval. Le style, courbé au sommet, se termine par un stigmate disposé obliquement.

Le fruit est une gousse sessile, linéaire, à deux valves. Elle renferme un nombre de graines variable selon les espèces et les variétés.

L'*Index Kewensis* mentionne une trentaine d'espèces répandues dans les régions tempérées et tempérées-chaudes du globe, particulièrement nombreuses dans la région méditerranéenne.

II. — Principales espèces de *Glycyrrhiza*

A. — *Glycyrrhiza glabra* L.

C'est un sous-arbrisseau de 1 à 2 m. de haut. La tige est glabre. Les feuilles sont composées de 9 à 17 folioles oblongues ou elliptiques lancéolées, obtuses. Les stipules, poilues, sont très petites, peu visibles.

Les fleurs, relativement petites, sont groupées en grappes allongées sur des rameaux florifères bien plus courts que la feuille à l'aisselle de laquelle ils se trouvent. Le calice est couvert de petits poils glanduleux. La corolle est formée de pétales tout à fait indépendants. L'ovaire est sessile, pluriovulé, à ovules disposés sur 2 rangées verticales ; il est surmonté d'un style filiforme que termine un stigmate obtus et oblique.

Les gousses sont très aplaties, bosselées par les graines qu'elles renferment, longues de 25 à 30 mm, larges de 5 à 7 mm. Elles contiennent un petit nombre de graines (3 à 4) lenticulaires, colorées en brun.

C'est une plante vivace, sans poils dans l'espèce type (sauf sur les stipules et le calice), à tige florifère dressée et à tige souterraine remarquable par ses rejets épais et allongés. Elle se perpétue par des bourgeons qui naissent sur ces tiges souterraines.

Cette espèce varie par la pilosité, la forme des folioles et du calice, la couleur des fleurs et la gousse plus ou moins glabre, parfois même épineuse.

Plusieurs variétés ont été décrites :

a) *Variété typica* REG. et HERD.

Cette variété est presque glabre.

— Les feuilles sont glutineuses en dessous.

— Les divisions du calice sont linéaires-lancéolées, souvent un peu plus longues que le tube.

— La corolle est bleu pourpré.

— La gousse, glabre, renferme 3 à 6 graines.

— Les stolons sont très nombreux.

Cette variété est indigène au Portugal, en Espagne (Vieille Castille, Navarre, Aragon, Valence, Andalousie), en Italie du Sud (Calabre, Sicile), en Grèce, Crimée, Caucase, Nord de la Perse.

Elle est cultivée en Angleterre (Mitcham, Yorkshire), en France (autrefois à Bourgueil, maintenant encore à Noirmoutier) et en Allemagne.

b) *Variété violacea* BOISS.

La plante est presque glabre.

— Les folioles sont plus petites, elliptiques.

— Les divisions du calice sont lancéolées-triangulaires.

— La corolle est violette.

— La gousse, glabre, renferme 4 à 7 graines.

Cette variété constitue la Réglisse « persane » qui est récoltée en Iran, Irak, dans les vallées du Tigre et de l'Euphrate.

c) *Variété glandulifera* WALDST. et KIT.

Certains auteurs en font une espèce (de CANDOLLE, 26) : elle figure au Codex français et dans de nombreuses Pharmacopées sous le nom de Réglisse de Russie. La tige est plus ou moins pubescente ou rugueuse, glanduleuse.

— Les folioles sont oblongues, lancéolées, glanduleuses en dessous, aiguës ou émarginées, à stipules marcescentes.

— La gousse est couverte de glandes saillantes, espacées ou serrées et contient 3-4 graines.

— Il n'y a pas de stolons.

Cette variété est abondante à l'état sauvage en Galicie, en Hongrie, dans le sud et le centre de la Russie, en Asie Mineure, Perse.

d) *Variété pallida* BOISS.

BOISSIER (18) indique les caractères suivants :

— Le calice est dépourvu de glandes.

— Les grappes de fleurs sont plus longues que les feuilles ; la corolle est blanc rosé.

Elle se trouve en Assyrie, aussi en Espagne, Italie, Portugal.

B. — *Autres espèces de Glycyrrhiza dont la racine
est utilisée occasionnellement*

1) *Glycyrrhiza asperrima* L.

— Tige glabrescente.

— Pétiole et pédoncule sont finement épineux.

— Les feuilles se composent de 4 à 5 paires de folioles obovales, mucronées.

— Les fleurs sont grandes, le calice papilleux, glanduleux.

— Gousses courbes, monoliformes, à 3-8 graines.

Cette espèce se trouve en Russie, Sibérie, Syrie, Irak, Turquie, autour de la mer Caspienne.

2) *Glycyrrhiza echinata* L.

La tige en est allongée, droite.

— Les feuilles sont composées de 5 à 6 paires de folioles allongées, elliptiques, mucronées.

— Les fleurs, groupées en épis denses, sont petites. Les divisions du calice sont de forme triangulaire.

— Les gousses allongées, obovales, comprimées, renferment 2 graines. Elles sont hérissées de poils épineux. En outre, la racine pivotante peut atteindre 5 cm de diamètre.

Cette espèce, originaire d'Orient, se rencontre en Italie, Dalmatie, également en Anatolie selon BAYTOP (8).

3) *Glycyrrhiza fætida* DESF.

— Folioles oblongues, mucronées, presque écailleuses.

— Fleurs jaunes.

— Gousse à 2 graines.

Cette espèce croît en Afrique du Nord.

4) *Glycyrrhiza lepidota* PURSH.

Décrite par CULLOUGH en 1890 (36).

— C'est une plante herbacée dont les tiges les plus jeunes sont vert pourpré et quelquefois pubescentes.

— Feuilles composées d'environ 17 folioles oblongues, lancéolées et aiguës.

— Fleurs blanchâtres disposées en épis pédonculés.

— Gousse comprimée avec 2-6 graines.

Rhizome de teinte brun foncé qui ressemble à celui de *Glycyrrhiza glabra*, de goût sucré devenant ensuite amer. Le bois est jaune.

Cette espèce pousse en Amérique du Nord (Minnesota, Colorado, Missouri) et est cultivée en Californie d'après HOCKING (68).

5) *Glycyrrhiza uralensis* FISCH.

— Tige dressée, pubescente.

— Folioles obovales obtuses, glabres, à stipules lancéolées.

— Calice velu.

Cette espèce se trouve en Sibérie, Monts Oural.

III. — Culture et récolte

La culture de la Réglisse se fait principalement par éclats de souche portant 2 ou 3 bourgeons et plantés au printemps à raison de 3-4 au m². Elle exige un sol de bonne nature et profond, bien fumé : la plante atteint 1 m. 20 à 1 m. 50 et produit des fleurs, mais généralement pas de graines en culture. Les racines sont arrachées au crochet au commencement de l'hiver, quand la plante a au moins 3 ou 4 ans. On recueille avec soin les diverses portions souterraines ; les racines lavées, nettoyées, triées par grosseur sont ensuite vendues entières à l'état frais, ou bien coupées en morceaux courts et séchées ; quelquefois on enlève préalablement l'écorce. Une légère fermentation en tas provoque la coloration de la drogue. Les rendements sont de l'ordre de 6.000 à 10.000 kg de racines sèches à l'hectare (LAUMONT, 83).

La Réglisse a été cultivée autrefois, en France, à Bourgueil en Touraine. Elle l'est encore actuellement dans l'Ardèche, à Frontignan, à Noirmoutier. C'est surtout en Espagne (Vallée de l'Ebre, Tortosa notamment) que cette culture est pratiquée (sur 1.000 à 2.000 ha) ; en Italie (Sicile et Calabre) où on adopte de préférence la singulière pratique de la cultiver dans les champs de blé ; en Angleterre, dans des proportions peu étendues ; en Asie Mineure, Russie, Etats-Unis (Californie), en Algérie (Hauts plateaux), Sud Marocain, Chine ; en Syrie (près de la frontière turque) et en Turquie, on récolte la Réglisse sauvage.

Nous avons utilisé, pour nos recherches, des racines de provenances différentes (Russie, Iran, notamment) mais sans avoir pu obtenir aucune précision sur les variétés botaniques expédiées.

CHAPITRE II

COMPOSITION CHIMIQUE

I. — Généralités

Les premières notions sur la composition chimique de la racine de Réglisse remontent au début du siècle dernier. En France, ALIBERT commence à en parler en 1808 (2) dans les « Nouveaux Eléments de thérapeutique et de Matière Médicale ». En 1809 ROBIQUET (120) donne une première analyse et signale l'existence d'une matière sucrée qui se rapproche des résines et qu'il parvient déjà à isoler en plaques jaunes, transparentes. ALIBERT en 1826 (2), dans une seconde édition de son ouvrage, mentionne que cette racine renferme : de la fécule amylacée, une substance sucrée « qui n'a rien d'analogue avec le sucre ordinaire » et désignée sous le nom de « saccogommite », une huile résineuse, des phosphates, et malates de chaux et de magnésie.

Cette saccogommite n'était autre que le « glycion » de FEAFF (1808) (112), mais ce principe était loin d'être pur. En 1885, à Montpellier, MAGROU (91) rappelle, dans sa thèse, les résultats des quelques analyses chimiques effectuées jusqu'alors.

En 1918, M^{lle} PICHARD (113) consacre sa thèse à l'étude pharmacologique de la Réglisse et dresse la liste des constituants alors connus : environ 4 % de sucres dont 2,5 % de saccharose, 1,5 % de glucose : le principe actif, la glycyrrhizine ou glycyrrhizate d'ammonium : 14 % de résine localisée dans l'écorce de la racine : des phosphates, oxalates, sulfates et malates de calcium et de magnésium.

Enfin dans un exposé récent, R. PARIS (104) résume la composition chimique, actuellement connue, de la racine de Réglisse.

— Eau : 6 à 8 % dans les racines sèches, jusqu'à 48 % dans les racines fraîches.

— Cendres : 2 à 6 %.

— Lipides : 0,5 à 1 %.

— Glucides : amidon : 25 à 30 %,

mannitol,

glucose : 1,4 %,

saccharose : 2,5 %.

— Glycyrrhizine (à l'état de sels calcique et ammoniacal) : 6 à 13 %.

[Ces chiffres se rapportent à *Glycyrrhiza glabra*. Il semble d'après SAG (125) que *G. echinata* et *G. uralensis* aient des teneurs analogues en glycyrrhizine].

— Asparagine : 2 à 4 %.

— des matières gommeuses, de la résine, des principes amers.

Ces derniers sont plus abondants dans certaines variétés. TREASE (135) citant HOUSEMAN indique des valeurs de 6 à 8 % de principes amers totaux et 2 à 4 % de résines.

En fait, jusqu'en 1934, la glycyrrhizine seule attire l'attention des chimistes. C'est seulement à cette date qu'un dérivé du groupe des flavonoïdes a été découvert par des auteurs japonais (128). Nous examinerons successivement les principaux résultats des travaux portant sur la glycyrrhizine puis sur les flavonoïdes et les substances œstrogènes.

II. — La Glycyrrhizine

La glycyrrhizine a suscité un grand nombre de recherches que nous ne citerons pas toutes d'ailleurs, CEDERBERG (29) puis VIRATELLE (142) l'ayant fait dans leurs thèses. Nombreux sont les auteurs qui tentent de l'isoler à l'état pur. En 1843, VOGEL (143) analyse une substance jaune clair et lui donne une formule brute en $C_{16}H_{26}O_6$. Trois ans plus tard, LADE (82) propose $C_{36}H_{48}O_{14}$ et met en évidence la présence d'azote mais l'attribue à une impureté. GORUP-BESANEZ (58) en 1861 pense qu'il s'agit d'un glucoside hydrolysable par les acides forts avec libération d'une molécule de « glycyrrhétine » et de deux molécules de sucre.

ROUSSIN (121) considère enfin en 1875 que la glycyrrhizine est un acide qui existe dans la plante à l'état de sels alcalins. Peu à peu, à la suite de nouveaux travaux, sa constitution est éclaircie, surtout après son isolement à l'état pur par TSCHIRCH et CEDERBERG en 1907 (136) puis TSCHIRCH et GAUCHMANN en 1908 (137). Il est alors démontré que l'acide glycyrrhizique n'est pas azoté, que sa formule brute est $C_{41}H_{61}O_{19}$, qu'il s'hydrolyse en donnant une molécule d'acide glycyrrhétique et deux molécules d'un acide uronique : acide glycuronique ou

galacturonique. Très nombreux sont les auteurs qui s'intéressent à sa constitution chimique et à son dosage ; nous citerons ERIKSSON (47) et CAPIN (27) en 1911, CORMINBŒUF (34), HOUSEMAN (70) en 1912, DURIER (42) en 1913, LINZ (87) en 1916, ZIMMERMANN (149). PICHARD (113), puis ASTRUC et PICHARD (5) en 1918.

En 1921, KARRER et coll. (76) confirment l'absence d'azote dans la molécule. TOCCO-TOCCO (134) est le premier à comparer le comportement de l'acide glycyrrhizique à celui des saponines. Un an après, BERTOLO (15) étudie certaines réactions colorées qui lui semblent dues à la formation de furfurol, après hydrolyse. PEYER (111), au même moment, confirme la classification de l'acide glycyrrhizique parmi les saponines. Son extraction et son dosage préoccupent toujours les chercheurs ; citons de nouveau HOUSEMAN (71) en 1921, puis FROMME (50) en 1924, la Pharmacopée Hollandaise de 1926, CEDERBERG (30) en 1927, EDER et SACK en 1929 (45).

Avec l'étude de BERGMANN (14) en 1933, la chimie de la génine commence à se préciser mais il n'est pas encore possible d'identifier avec certitude l'acide glycuronique, même à l'état de 2-4 dinitrophénylhydrazone.

Voss et ses collaborateurs (145) en 1937 publient une autre technique de purification et obtiennent différents sels purs. D'après ces derniers auteurs, la formule brute serait $C_{42}H_{62}O_{16}$ et celle de l'acide glycyrrhétique $C_{30}H_{46}O_4$; celui-ci pourrait se présenter sous deux formes isomères α et β , facilement transformables l'une dans l'autre. Monoacide, il ne possède en outre qu'un seul hydroxyle. RUZICKA et ses collaborateurs (122) reprennent et précisent la structure de l'acide glycyrrhétique ; ils confirment l'existence de 2 isomères α et β et la formule en $C_{30}H_{46}O_4$; de ces 4 atomes d'oxygène, deux appartiennent au carboxyle, un à l'hydroxyle et le dernier à un groupement carbonyle : enfin la structure s'apparente à celle des substances triterpéniques (acide oléanolique et amyrines). VIRATELLE en 1938 (142) retrace cet historique et s'attache particulièrement aux méthodes de dosage. Les recherches pour déterminer la configuration exacte de l'acide glycyrrhétique se poursuivent. RUZICKA et JEGER en 1942 d'une part (123), BILHAM et collaborateurs d'autre part (17), étudient la position du carboxyle. RUZICKA et JEGER réalisent des investigations encore plus poussées en 1943 (124). Pourtant NIEMAN (99), en 1952, remarque que si la constitution de l'acide glycyrrhétique est mieux connue, la formule proposée n'est pas absolument indiscutable bien que la structure triterpénique soit définitivement admise. L'aglycone est liée à deux molécules

d'acides uroniques unis sous forme d'un disaccharide, mais ce mode de liaison et la nature des deux acides restent discutables. On pense qu'il s'agit d'acide glycuronique, mais LYHTCOE et TRIPPETT (90), en 1950, concluraient plutôt à l'acide d. mannuronique. DJERASSI et collaborateurs (39) en 1954 confirment la formule de l'acide glycyrrhétique proposée par RUZICKA et JEGER en $C_{30}H_{46}O_4$.

Propriétés physico-chimiques de l'acide glycyrrhizique :

La glycyrrhizine commerciale, ou glycyrrhizate d'ammonium, est obtenue par précipitation acide d'une solution extractive de Réglisse. Le précipité, après lavage, est redissout dans l'ammoniaque. On évapore sur une surface plane. Elle se présente sous forme d'écailles noirâtres et brillantes, solubles dans l'eau, de saveur sucrée.

Pur, l'acide glycyrrhizique se présente sous forme d'une poudre cristalline ou de prismes blancs. La cristallisation se fait dans l'acide acétique glacial.

- inodore ; au goût il ne devient très sucré qu'à l'état de sel alcalin ;
- peu soluble dans l'eau froide, il se dissout facilement dans l'eau chaude, mais la solution, par refroidissement, forme un gel colloïdal ;
- soluble dans l'alcool dilué, l'alcool à 96° bouillant, l'acétone ;
- insoluble dans l'alcool absolu, l'éther, le chloroforme, l'éther de pétrole ;
- dextrogyre $[\alpha]_D = + 62^{\circ}1$ (dans l'acide acétique à 33 %) ;
- point de fusion peu net situé vers 205°-220° (bloc Maquenne) ;
- les solutions aqueuses moussent abondamment par agitation ;
- c'est un triacide donnant des sels, neutres et acides : les glycyrrhizates, qui sont très sucrés et solubles dans l'eau ;
- il n'est pas réducteur ;
- la formule brute est $C_{42}H_{62}O_{16}$.

Propriétés physico-chimiques de l'acide glycyrrhétique :

Aglycone provenant de l'hydrolyse acide de l'acide glycyrrhizique, il existe sous deux formes isomères :

- la forme α , en plaquettes, cristallise dans l'alcool dilué (point de fusion vers 283°) ;
- la forme β , en aiguilles, cristallise dans un mélange alcool-éther de pétrole (point de fusion : 296°).

Les deux formes sont solubles dans le chloroforme, le dioxane. L'acide glycyrrhétique est inodore et insipide.

La formule brute est $C_{30}H_{46}O_4$ et la formule développée, selon RUZICKA, est la suivante (avec un hydroxyle en 3, un carbonyle en 11, une double liaison en 12-13 et un carboxyle en C_{20}) : (fig. 1).

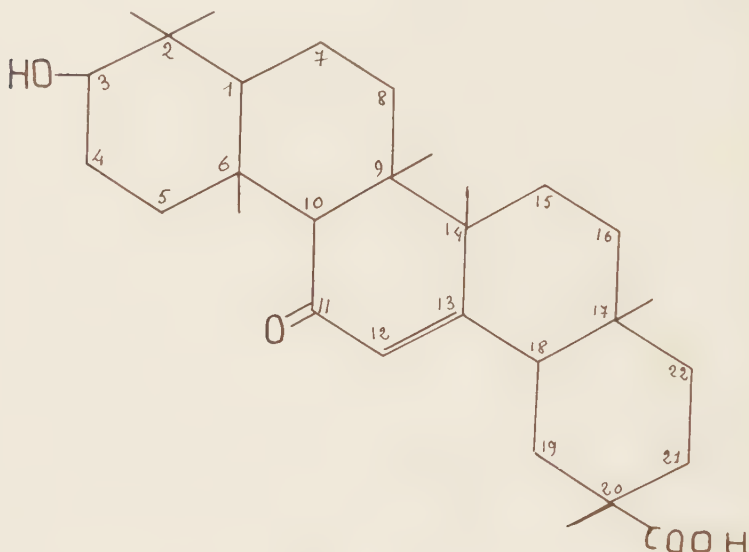


FIGURE 1. — Formule de l'acide glycyrrhétique (d'après RUZICKA).

Enfin signalons qu'en 1956 BEATON et SPRING (9) ont isolé un nouvel acide triterpénique, l'acide glabrique. Dans un extrait aqueux de racine de Réglisse, la glycyrrhizine brute est précipitée par l'acide sulfurique. Elle est hydrolysée. L'acide glycyrrhétique obtenu est acétylé. Ce dérivé acétylé, étherifié par le diazométhane et l'acétate de méthyle, est purifié par chromatographie sur colonne d'alumine. Après plusieurs recristallisations, les auteurs obtiennent l'acide glabrique en $C_{30}H_{46}O_5$, comportant deux hydroxyles et qui présenterait une absorption ultra-violette caractéristique d'une cétone α - β insaturée, mais ne donne pas de coloration avec le tétranitrométhane, caractéristique des doubles liaisons dans le noyau triterpénique.

III. — Les dérivés flavoniques

En 1934, des auteurs japonais isolaient de la racine de Réglisse (*Glycyrrhiza glabra* var. *glandulifera*) un dérivé appartenant au groupe des

flavonoïdes et appelé par eux « liquiritoside ». SHINODA et UEEDA (128) l'obtiennent à partir d'un extrait méthanolique de la racine. Après concentration, la substance cristallise. Elle fond à 212° et peut être hydrolysée en une molécule de glucose et une molécule d'aglycone qui, elle, fond à 207°. La solution alcoolique de ce glucoside ne donne pas de coloration avec le chlorure ferrique : elle se colore en rouge violacé sous l'influence du magnésium en présence d'acide chlorhydrique (réaction de la cyanidine, tant utilisée pour caractériser les flavonoïdes). Les auteurs indiquent une formule brute en $C_{21}H_{22}O_9 \cdot H_2O$ et pensent que la substance est identique au produit qu'ont obtenu, peu de temps avant eux, deux autres japonais FUJITA et TSUDA (52). L'aglycone a pour formule $C_{15}H_{12}O_4$ et dans la solution d'hydrolyse les auteurs ont obtenu de la phénylglucosazone. Le spectre d'absorption ultra-violet s'apparente à celui des flavanones. Le liquiritoside est donc un glucoside flavanonique. Les auteurs procèdent à une série d'analyses sur la génine (méthylation, acétylation, décomposition alcaline, etc...) et concluent qu'il s'agit bien de la dihydroxy-4'-7 flavanone dont la formule développée est la suivante (Fig. 2) :

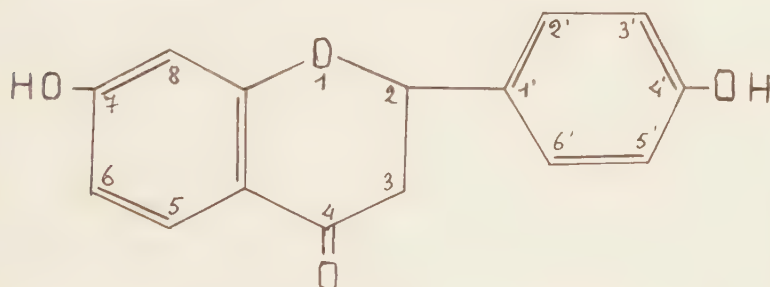


FIGURE 2. — Formule de la liquiritigénine (flavanone).

En 1954, deux auteurs hindoux, PURI et SESHADRI (117), apportent confirmation de cette étude, alors même que nos travaux sont commencés et font l'objet d'une communication préliminaire (106). Ils parviennent en outre à isoler des liqueurs extractives alcooliques, après défécation par le plomb, une substance isomère, dénommée par eux isoliquiritoside. Cette substance, colorée en jaune, alors que la flavanone est incolore, ne donne pas la réaction de la cyanidine.

Elle se décompose vers 185-186°. Sa formule brute est $C_{21}H_{22}O_9$ avec 3 molécules d'eau. Hydrolysée, elle fournit une molécule de glucose (caractérisé à l'état de glucosazone) et une molécule de génine. L'isoli-

quiritigénine fondant vers 202-204°. Celle-ci, isomère de la liquiritigénine de SHINODA, possède une structure chalconique, les deux formes se convertissant facilement l'une dans l'autre. C'est la trihydroxy 2-4-4'-chalcone et on ignore encore où se fait la liaison glucosidique (Fig. 3).

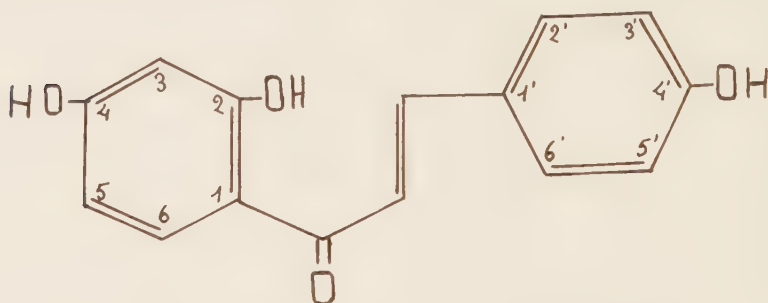


FIGURE 3. — Formule de l'isoliquiritigénine (chalcone).

IV. — Les substances œstrogènes

En 1950, deux auteurs américains, COSTELLO et LYNN (35) ont trouvé que la Réglisse renfermait une substance d'activité œstrogène appréciable. Les plantes douées de cette activité sont assez nombreuses.

En effet dès 1926-1927, LIEWE, LANGE et SPOHR (88) mettent en évidence par le test d'ALLEN et DOISY (3) chez la rate castrée la présence d'hormones sexuelles dans les chatons femelles de Saule, les graines de Nénuphar, les tiges d'*Impatiens parviflora*, etc... Ils donnent même à ces substances, le nom de « thélykinines ». Puis DOURN et ses collaborateurs (40) décèlent un principe agissant comme la folliculine dans les cellules de levure, les graines de Betterave sucrière, les racines de Persil, etc... Ils proposent alors le nom de « tokokinine » pour les désigner. Nombreux sont les auteurs qui viennent compléter cette liste : FELNER (49) en 1926 met en évidence un principe œstrogène dans la farine d'Avoine et de Riz, WALKER et JANNEY (140) en 1930 dans l'Aulne, la Rhubarbe, MUCH (97) en 1931 dans les fleurs de Surreau, de Tilleul et d'Ortie, GLASER et DROBNIK (55) dans l'Ail, R. PARIS (101) en 1946 dans un faux Ginseng, le *Rodgersia aesculifolia*.

Au point de vue chimique, les substances œstrogènes n'ont été isolées et identifiées que dans quelques cas seulement.

En 1933, BUTENANDT et JACOBI (24) réussissent l'extraction de la folliculine cristallisée ($C_{18}H_{22}O_2$: P. F. 250°) à partir des noyaux de

dattes, en utilisant une méthode analogue à celle qui permet de séparer cette hormone de l'urine. La même année SKARZYNSKI (130) isole l'œstriol à partir des chatons de Saule. En 1940, BUTENANDT (25) obtient à partir du *Butea superba* une autre substance cristallisée d'activité œstrogène élevée, active par voie buccale, et différente de la folliculine déjà isolée par lui précédemment ($C_{19}H_{20}O_6$; P. F. = 260°). En 1947, HASSAN et WAFA (65) caractérisent l'œstrone dans le pollen de Dattier.

En ce qui concerne la Réglisse, COSTELLO et LYNN remarquent que l'activité œstrogène varie avec les échantillons utilisés et décident de pousser plus avant leurs investigations. Ils épuisent alors séparément différentes portions d'un même lot de Réglisse par plusieurs solvants (éthanol à 95°, isopropanol, benzène, éther, acétone, eau sodée, alcool sodé, eau) : après élimination du solvant, les résidus sont repris par l'alcool à 95° et ces extraits sont injectés aux rates castrées. Les auteurs trouvent que l'extrait alcoolique à 95° est le plus actif, provoquant l'œstrus à des doses correspondant à une quantité de 0 g 34 à 1 g 20 de plante entière.

Ils essaient alors, à partir de l'extrait alcoolique total obtenu par épuisement au Soxhlet, d'isoler un principe actif à l'aide des méthodes de fractionnement des hormones décrites pour la séparation de ces substances à partir de l'urine. C'est ainsi qu'ils en viennent à appliquer :

1) LA MÉTHODE DE PINCUS (114)

L'extrait alcoolique sec est hydrolysé par chauffage avec de l'acide chlorhydrique concentré pour éliminer les résines, puis épuisé par l'éther : la solution éthérée est saturée par une solution de CO_3Na_2 ; la phase alcaline acidifiée est reprise par l'éther et évaporée. Elle fournit la fraction phénol total. Celle-ci est dissoute dans l'alcool et purifiée par précipitation dans l'eau. COSTELLO et LYNN obtiennent une poudre jaune amorphe dont l'activité ne correspond pas à celle de l'extrait de départ. Ils pensent que les lavages au carbonate disodique éliminent en partie l'activité.

2) LA MÉTHODE DE SKARZYNSKI (130)

Cet auteur la mit au point pour extraire la substance œstrogène des fleurs et des feuilles de Saule. L'extrait alcoolique de la plante n'est pas hydrolysé comme dans la méthode de Pincus, les résines éliminées au cours de cette opération pouvant renfermer des substances actives. COSTELLO et LYNN remarquent d'ailleurs que tel est le cas pour la Réglisse. Après

alcalinisation, les phénols sont libérés en saturant par le gaz carbonique. Ce sont là les deux différences essentielles de cette méthode.

COSTELLO et LYNN obtiennent un produit dont le point de fusion est 194-196° et des cristaux incolores fondant à 191-122° qu'ils ont identifiés à l'acide benzoïque.

3) Les auteurs préconisent une troisième méthode où le résidu de l'extrait alcoolique est d'abord repris par l'éther, la fraction insoluble étant inactive. La solution étherée est épuisée par la soude 2 N ; les liqueurs alcalines acidifiées, reprises par l'éther, fournissent les phénols totaux qui sont purifiés par reprise par le benzène, alcalinisation, acidification et nouvelle reprise par l'éther. On obtient finalement un extrait mou, brun foncé, actif à la dose de 0 g 02, ainsi que des cristaux d'acide benzoïque.

4) LA MÉTHODE DE MARRIAN (93)

L'extrait alcoolique est épuisé par l'éther. Cet extrait étheré est repris à chaud par la potasse à 5 %. Après saturation par le gaz carbonique on épuise à nouveau par l'éther ; le résidu d'évaporation (insaponifiable) est traité par l'acétone, puis par l'alcool à 50°. Après purification par dissolution en milieu alcalin concentré, puis acidification et reprise par un solvant, on obtient un résidu brun foncé représentant 0.075 % de la drogue et actif à la dose de 0 g 02.

COSTELLO et LYNN poursuivent la purification de cette fraction et obtiennent enfin un extrait brun foncé représentant 0.035 % de la drogue mise en œuvre et actif à la dose 0 g 002 à 0 g 003. C'est la fraction la plus active qu'ils soient parvenus à isoler.

D'après le spectre d'absorption de la solution dans l'alcool à 95° il s'agirait d'œstriol. Les auteurs terminent leur étude en remarquant que l'activité des extraits ne croît pas régulièrement avec les doses administrées et qu'il existerait donc dans la plante, à côté des principes œstrogènes, un principe antihormonal.

CHAPITRE III

ACTION PHYSIOLOGIQUE

I. — Historique

La Réglisse (*Glycyrrhiza glabra*, Légumineuses-Papilionacées) est une drogue végétale dont l'emploi remonte à des temps très reculés. Elle était, dit-on, déjà recommandée par les Egyptiens et souvent utilisée chez les Grecs et les Romains. Nous devons au Docteur H. LEClerc (85) une pittoresque mise au point historique de cette plante.

THÉOPHRASTE (133) l'appelle « racine douce » et rapporte que, mélangée au miel, elle guérit les ulcères : mais ses bienfaits sont encore plus nombreux car elle est active contre l'asthme, la toux sèche, les douleurs thoraciques et, mâchée, préserve de la soif. DIOSCORIDE (38) compare son aspect à celui de la racine de Gentiane et énumère à peu près les mêmes propriétés. Associée, cette fois, à du raisin sec, elle combat les douleurs de la vessie et des reins. En outre, on en fait souvent un onguent pour les blessures. Plus tard, PLINIE (115) parle aussi de la Réglisse mais on se demande s'il ne s'agit pas d'une espèce voisine (*G. echinata*), car il la décrit comme une plante épineuse. On sait encore que les médecins arabes utilisaient souvent les décoctions de racine contre la toux, et le suc contre la soif et les dysménorrhées : puis, détail intéressant, ils l'associent aux drogues purgatives afin d'en améliorer la tolérance. En Chine, on constate déjà que son emploi prolongé amène l'apparition d'œdèmes.

En Europe occidentale, l'usage de la Réglisse est beaucoup plus tardif. Au Moyen-Age, la drogue s'appelle, entre autres, « liquiritia », « lico-rice », « rigolice » ... Ste Cunégonde l'aurait fait cultiver et Ste Hildegarde rendait hommage à ses vertus. Au XIII^e siècle le commerce de la Réglisse est florissant en Italie. Elle est employée surtout dans les affections vésicales et rénales, notamment dans les lithiases ; la drogue, à l'état frais, est associée au lait de chèvre, ou encore à la casse ou à la térébenthine.

Puis, elle tombe dans l'oubli, ou, du moins n'a plus que des applica-

tions secondaires comme expectorant et comme correctif de goût dans un nombre considérable de formules. Au début du XIX^e siècle, CHAUMETON (32), dans sa Flore médicinale, énumère une quantité innombrable de médicaments dans lesquels elle entre : sirops, tablettes, électuaires, pâtes, etc... Rappelons ici que NAPOLEON I^{er}, souffrant d'une affection stomacale, avait les dents noires à force de sucer du suc de Réglisse, remède qui lui avait été indiqué par un guérisseur.

En médecine populaire, le « bois » de Réglisse mâché ainsi que son suc ont servi à se préserver de la soif, (il se peut que dans ce cas la Réglisse agisse en modifiant le métabolisme des ions sodium et potassium), procurant une sensation de fraîcheur. A cet effet, le breuvage vulgairement dénommé « coco » résulte de la macération des racines dans l'eau froide, additionnées ou non d'une substance pour favoriser la dissolution (bicarbonate de sodium, ou jus de citron, coriandre, etc...)

La Réglisse, aussi bien sous forme de suc dans diverses pâtes pectorales qu'en décoctions aqueuses, demeure encore de nos jours le remède populaire de la toux et de l'enrouement. C'est un expectorant et un béchique. Le suc est absorbé dissous dans des tisanes ou même dans du lait chaud, constituant le fameux « lait de corbeau » dont l'administration était jadis classique dans les rhumes.

La décoction aqueuse de racines fut même utilisée, tiède, en bains de bouche, dans les glossites, car elle procurait soulagement et quelquefois guérison, et dans le muguet, car elle était capable de s'opposer au développement des spores de l'*Oidium albicans* (LECLERC) (84, 85). Enfin la Réglisse est encore demeurée l'édulcorant, le correcteur de goût par excellence. A ce titre elle figure dans une multitude de formules médicamenteuses et fut notamment utilisée pour lutter contre l'amertume de la quinine ; CAPIN avait, dans ce but, préparé un sulfate double de quinine et de glycyrrhizine.

II. — Propriétés pharmacologiques

Nous passerons ici en revue par ordre chronologique les principaux travaux effectués avec la drogue elle-même, le suc ou les constituants qui en ont été isolés.

En 1808, ALIBERT (2) classe la drogue parmi les « Médicaments que la médecine emprunte du règne végétal et qui agissent d'une manière spéciale sur les propriétés vitales du système de la respiration pour modérer l'excès de la chaleur animale ». C'est dire en beaucoup de mots

qu'elle n'est considérée à cette époque que comme un rafraîchissant capable « d'apaiser les ardeurs de la soif ». C'est en effet un « désaltérant aussi commode qu'agréable ».

En 1818 CHAUMETON (32) récapitule à son tour tous ses emplois dans l'Antiquité et énumère un nombre impressionnant de formules de son époque où la Réglisse n'entre que très accessoirement.

Il faut attendre les travaux de TOCCO-TOCCO en 1924 (134) pour s'apercevoir que la glycyrrhizine agit comme les saponines et qu'elle est toxique. Si, par voie stomacale, elle est bien tolérée, par voie sous-cutanée, elle détermine irritation et inflammation au niveau du point d'injection et par voie intraveineuse se révèle très toxique. La mort est précédée de symptômes cardiaques et nerveux car elle possède une action paralysante sur le système nerveux central, une action dépressive sur le cœur. C'est en outre un poison protoplasmique, un poison des leucocytes et des organismes unicellulaires : elle est ichthyotoxique à la dilution de 1 2.000. Son pouvoir hémolytique faible et quelquefois contesté fut confirmé par BUSACCA (22) en 1931. VELLUZ (138), en 1932, reconnaît au glycyrrhizate de potassium le pouvoir d'inhiber la toxine tétanique, mais ce sel reste sans effet sur la toxine diphtérique.

La même année, BUSQUET (23) est le premier à signaler que la Réglisse « n'est pas, comme on le croit, une drogue complètement inerte ». Elle est capable, en effet, de diminuer la fréquence et l'amplitude des contractions de l'intestin isolé de lapin. Elle les arrête même complètement à la concentration de 10 %, qui est celle de l'infusion parfois utilisée chez l'homme. L'auteur rend la glycyrrhizine responsable de cette action et se demande alors si la présence de la Réglisse dans la poudre de Réglisse composée de la Pharmacopée Française (poudre laxative) est bien justifiée.

Un peu plus tard VOLLMER et WEIDLICH (144), en 1937, remarquent que la racine de Réglisse n'exerce aucune influence sur l'excrétion urinaire des lapins, mais augmente sensiblement celle des souris.

Le mérite revient à REVERS (118) en Hollande, en 1946-48, d'avoir introduit d'une façon systématique la Réglisse dans la thérapeutique des ulcères de l'estomac. A la lumière de ces premières observations NELEMANS-STAMPERIUS, en 1949, effectue des recherches pharmacologiques qui constituent le sujet de sa thèse, publiée à Utrecht la même année (98).

Il utilise pour toutes ses expériences le suc de Réglisse qui résulte, comme dans la Pharmacopée française, de l'évaporation de l'extraît aqueux de racine de Réglisse (*Glycyrrhiza glabra*). Ce suc est employé

en solution aqueuse à 10 %. Il en détermine la toxicité aiguë chez la souris. Qu'il soit administré par voie buccale, sous-cutanée ou intraveineuse, presque tous les animaux meurent par arrêt respiratoire à la dose de 5 g/Kg.

Il possède une action antispasmodique évidente sur l'intestin isolé (intestin grêle de cobaye ou de lapin, ou duodénum isolé de rat). L'amplitude et la fréquence des contractions spontanées sont diminuées par 40 à 50 mg de suc ; il en est de même pour les contractions provoquées par l'histamine, le chlorure de baryum ou l'acétylcholine. A la dose de 200 mg les contractions sont complètement inhibées. Des résultats semblables sont obtenus sur l'utérus isolé de rat et du cobaye, et sur l'estomac isolé de grenouille.

L'auteur trouve ensuite que 10 à 20 mg du suc injectés dans la veine fémorale de chats décapités et décervelés provoquent une baisse de pression artérielle. Mais les résultats ne sont pas proportionnels à des doses croissantes. De plus, ils sont inconstants.

Sur l'intestin de chat, *in vivo*, l'administration intraveineuse de 300 à 400 mg de suc provoque l'arrêt complet des contractions spontanées ou provoquées par l'ésérine. Chez le lapin, par voie buccale, 4 g de suc produisent un effet analogue environ 30 minutes après l'ingestion. L'effet se maintenant pendant 6 heures environ.

La drogue n'a, d'autre part, aucune influence sur les mouvements respiratoires, mais elle provoque la diminution, puis l'arrêt, des contractions du cœur chez la grenouille. L'auteur ne constate pas l'apparition d'œdème par suite d'ingestion prolongée chez le cobaye, le rat et le chien.

Ce travail se termine enfin par une étude sur les ulcères expérimentaux créés chez les animaux et traités en même temps par la Réglisse. Deux techniques sont utilisées : soit l'injection d'histamine chez le cobaye, soit la ligature du pylore chez le rat. Les animaux traités préventivement ou curativement présentent des ulcérations moins graves et moins nombreuses, parfois même ils en sont dépourvus. NELEMANS-STAMPERIUS conclut que l'action curative du suc à l'égard des ulcères gastriques est due à son activité antispasmodique.

Des auteurs japonais, en 1950, GOTO et coll. (60) étudient l'action de l'acide glycyrrhétique sur le cœur isolé de crapaud. Ils notent un antagonisme marqué à l'égard de l'ésérine, l'acétylcholine, la pilocarpine, la yohimbine, et faible à l'égard de l'histamine, ainsi qu'un effet puissant sur la pression sanguine.

A cette même époque, COSTELLO et LYNN (35) furent les premiers à mettre en évidence l'activité œstrogénique de la Réglisse et, nous

l'avons déjà vu, à tenter l'isolement d'un principe actif défini à l'aide de diverses techniques de séparation des œstrogènes mises au point à propos de l'urine. Ils obtiennent ainsi une fraction très active pour laquelle, du point de vue expérimental, seul le test d'ALLEN et DOISY fut pratiqué, chez la rate castrée. Aucun autre essai pharmacodynamique ne fut tenté, de même aucun essai clinique.

A la lumière des travaux de NELEMANS-STAMPERIUS, la Réglisse connaît une véritable résurrection et son emploi devient courant en Hollande dans les services de gastro-entérologie. REVERS (119), qui continue en 1951 à l'administrer à ses malades, obtient une amélioration de leur état dans des cas de gastrite, mais il est le premier à constater en même temps l'apparition de phénomènes d'intolérance (maux de tête, œdèmes, douleurs abdominales, etc...).

STRONG (132) au cours du traitement de plusieurs malades par du P. A. S. administré oralement et accompagné d'extrait de Réglisse comme édulcorant, observe également un certain nombre de troubles et pense, à la suite des remarques de MOLHUYSEN et coll. (96) que la Réglisse est responsable de ces accidents. Tous ces auteurs signalent que, même lorsque aucun œdème n'apparaît, il résulte de son emploi prolongé : une rétention d'eau, des ions sodium et chlorures, une élimination accrue des ions potassium, une augmentation des taux d'hémoglobine et des protéines totales du sérum, enfin un accroissement de la pression veineuse, sanguine et artérielle.

La même année, GROEN, PELSER et coll. (61) obtiennent des résultats encourageants dans plusieurs cas de maladie d'ADDISON.

En France, VINCENT (139) reprend alors l'étude de l'action antispasmodique de la Réglisse. Il utilise, pour ses expérimentations, non pas le suc mais une décoction aqueuse de racines à 10 %. En 1951 paraît une première étude sur l'antagonisme de la drogue à l'égard de l'acétylcholine. Chez le chien chloralosé, la décoction de Réglisse injectée dans la saphène détermine une hypotension d'intensité et de durée variables selon les doses injectées et les sujets en expérience. Cet effet hypotenseur n'est pas dû à la présence d'acétylcholine dans la drogue. Des essais effectués avec la glycyrrhizine commerciale en solution à 1 % n'ont pas permis d'observer des chutes de pression comparables. L'auteur étudie ensuite l'influence de la Réglisse sur les effets pharmacologiques de l'acétylcholine : d'abord sur l'effet hypotenseur de l'acétylcholine injectée par voie veineuse chez le chien chloralosé : injectée seule elle détermine une hypotension brève mais immédiate et proportionnelle aux doses administrées. En présence de Réglisse, il se

produit d'abord une légère remontée de pression due à l'effet propre de la drogue, l'hypotension acétylcholinique étant ensuite moindre et plus étalée. Une seconde expérience sur le muscle dorsal de sangsue permet d'observer une légère inhibition des contractions provoquées par l'acétylcholine, mais l'effet est particulièrement net sur l'iléon isolé de cobaye, à tel point que la sensibilité à l'acétylcholine est abolie totalement. Des essais avec la glycyrrhizine commerciale ont permis de constater des effets analogues. On serait alors tenté de considérer la glycyrrhizine comme le principe actif de la Réglisse, mais VINCENT pense que le produit commercial est beaucoup trop impur. Il complète enfin cette étude par un essai sur les cholinestérases du sérum et du cerveau de mouton. La Réglisse possède bien un très léger pouvoir inhibiteur, *in vitro*, mais qui ne permet pas d'expliquer l'effet antiacétylcholinique de la Réglisse.

En 1952, VINCENT (140) étudie l'action de la drogue à l'égard de l'histamine. Chez le chien chloralosé, l'injection de décoction de Réglisse n'apporte pas de modification significative à la réponse hypotensionnelle enregistrée après l'injection d'histamine. Mais sur l'iléon isolé de cobaye, les contractions provoquées par addition d'histamine au bain de Tyrode accusent, sous l'influence de la décoction de Réglisse, une inhibition réversible. En présence de glycyrrhizine commerciale, on enregistre à peu près la même action. En outre la Réglisse n'exerce aucun effet protecteur à l'égard du bronchospasme histaminique.

REVERS (119) remarque que l'acide glycyrrhizique ne possède pas les propriétés curatives du suc de Réglisse sur les ulcères gastriques et que les œdèmes qui sont apparus lui sont imputables.

HÖLLER et SCHIRMER (69), à la même époque, constatent expérimentalement que l'élimination des protéines et de la glycyrrhizine du suc de Réglisse ne diminue pas son action antiulcéreuse. A partir de ce moment on utilisera beaucoup en thérapeutique des extraits dits déglycyrrhizinés, qui renferment une proportion moindre de glycyrrhizine mais n'en sont pas totalement privés.

En 1953, un grand nombre d'articles sont publiés. GUTMANN et KANOUI (63), en France, expérimentent un extrait de Réglisse sur l'ulcère histaminique du cobaye d'après la technique de PASTEUR-VALLÉRY-RADOT, HALPERN et MARTIN (108), puis chez l'homme, dans les gastrites et les ulcères gastro-duodénaux. HENNEMANN et KUNERT (66), en Allemagne, remarquent qu'un suc de Réglisse sans glycyrrhizine ne provoque pas de phénomènes d'intolérance. Il émettent l'idée que, à côté de l'acide glycyrrhizique qui a une action sur l'équilibre électrolytique, il existerait vraisemblablement une autre substance respon-

sable de l'activité spasmodique et curative de la drogue. IRLE (73) publie un certain nombre d'observations cliniques avec examens radiographiques d'ulcères gastriques et duodénaux avant et après traitement par la Réglisse. BORST et coll. (19) puis SCHULZE et FRANKE (126) concluent que, à moins d'employer un suc purifié, les réactions secondaires indésirables apparaissent. GORSE (57) note une action nettement favorable dans les gastrites, antalgique dans les ulcères et pratiquement nulle dans les dyspepsies des gastrectomisés. FAIRBAIRN (48), en Angleterre, souligne les effets favorables de l'extrait de Réglisse dans les ulcères gastriques mais 20 % de ses malades ont vu se développer de l'asthme cardiaque pendant le traitement. EERENS (46), en Belgique, retrace l'action favorable de la drogue dans les ulcères gastriques et, dans un second article, rapporte qu'un suc renfermant moins de glycyrrhizine conserve cependant tout son pouvoir spasmodique. A la suite de toutes ces constatations KÖHLER (78) puis KUNERT (80) publient en 1954 deux méthodes de préparation de suc de Réglisse sans glycyrrhizine, par précipitation de ce principe à l'aide d'acide sulfurique dilué.

Entre temps l'action de la Réglisse sur le métabolisme de l'eau et des sels, action dite « cortisone-like », fait aussi l'objet de nombreux écrits. BORST et coll. (19) constatent la synergie Réglisse-cortisone. CARD et coll. (28) expérimentent cliniquement des extraits totaux de Réglisse, ainsi que l'acide glycyrrhétique. Cependant, ils observent que, chez des rats surrénalectomisés, le temps de survie, qui est prolongé par la désoxycorticostérone, ne l'est ni par la Réglisse, ni par ses dérivés. Le mécanisme d'action reste donc obscur. PELSER et coll. (109) comparent l'activité de l'acide glycyrrhizique et celle de l'acide glycyrrhétique et trouvent que le premier possède une action plus prolongée. Ils administrent quotidiennement 3 à 5 g d'acide glycyrrhétique à des addisoniens, ou bien 20 à 40 g de suc de Réglisse. Dans un travail plus étendu, GROEN et ses disciples (62) essayent de trouver une relation entre la structure chimique et l'action pharmacologique (structure triterpénique de l'acide glycyrrhétique et noyau pentaphénanthrénique des hormones cortico-surrénales).

VINCENT (141), en 1954, effectue une troisième étude sur la Réglisse. Il provoque des ulcères gastriques chez le chien par ingestions répétées de cinchophène et administre ensuite par sonde œsophagienne 6 à 8 g d'extrait sec de Réglisse (atomisé Dausse) par jour. Les animaux témoins ne recevant pas de Réglisse présentent un amaigrissement accentué, des vomissements et, après sacrifice ou mort spontanée, soit plusieurs ulcérations gastriques, soit un ulcère unique. Les animaux

traités ont également maigri, les vomissements étaient moins intenses et l'examen des muqueuses gastriques a révélé une réduction très nette des ulcères à la fois en nombre et en dimensions et même l'absence totale d'ulcère dans un tiers des cas. En résumé 50 à 60 % des animaux ont été protégés par la Réglisse.

La même année, HASSAN et coll. (64) administrent à des rats surrénalectomisés, un extrait de Réglisse d'Espagne, de la glycyrrhizine commerciale, du glycyrrhizate monoammoniacal et de l'acide glycyrrhétique et comparent leurs effets respectifs sur les ions à ceux de l'acétate de désoxycorticostérone. L'acide glycyrrhétique présente l'action la plus faible. ADAMS (1) précise que le suc de Réglisse ne peut exercer son effet de type D. O. C. A. que si la surrénale produit une quantité minimum de cortisone ou d'un stéroïde apparenté. HUDSON et coll. (72) étudient aussi ce renforcement de l'action de la cortisone.

KATWIJK et HUIS IN'T VELD (77) essaient de suivre le métabolisme de l'acide glycyrrhétique chez l'homme, mais ils n'en retrouvent pas trace dans l'urine des malades auxquels ils en font absorber. Ils tentent alors d'en détecter des catabolites. Enfin GOSSET (59) obtient avec la Réglisse des résultats très satisfaisants dans les gastrites.

Avec R. PARIS en 1955 (106), nous avons déterminé l'activité antispasmodique du liquiritoside sur les contractions spontanées et provoquées de l'intestin isolé de lapin.

La même année, en Autriche, BERGER et HÖLLER (11, 12) constatent sur différents suc de Réglisse commerciaux qu'il n'existe effectivement aucune corrélation entre leurs teneurs en acide glycyrrhizique et leur action spasmolytique. Ils dosent l'acide glycyrrhizique des suc par la méthode colorimétrique de FUCHS au naphtorésorcinol et comparent leur action spasmolytique à celle du chlorhydrate de papavérine.

NISHIYAMA (100) rappelle l'action favorable de la Réglisse dans les ulcères peptiques, dans les ulcères expérimentaux obtenus chez le rat par ligature du pylore, ainsi que l'hypokaliémie et l'hypernatrémie obtenues chez les lapins surrénalectomisés. Ces actions sont nettes avec un extrait de Réglisse ainsi qu'avec de la glycyrrhizine. GALAL (53) étudie l'action de l'acide glycyrrhétique sur le métabolisme de l'eau et MITCHELL (94) trouve que cette activité correspond au 1/20^e de celle de la cortisone.

En 1956, LOUIS et CONN (89) constatent que le glycyrrhizate d'ammonium extrait par eux de la plante n'a d'effet ni sur le métabolisme des protéines et des glucides, ni sur l'excrétion rénale de l'acide urique et de la créatinine : par contre l'effet sur le métabolisme des électrolytes est particulièrement net.

MITCHELL (95) publie, la même année, une nouvelle étude et constate que l'acide glycyrrhizique et l'acide glycyrrhétique montrent une activité minéralo-corticoïde considérable et aucune activité glucocorticoïde (le test au glycogène sur le foie de rat est utilisé). Il signale en outre que d'excellents résultats viennent d'être constatés avec l'acide glycyrrhétique dans le traitement de certaines dermatoses et comme anti-inflammatoire.

DESMAREZ (37), puis LA BARRE et DESMAREZ (81), aux « Journées Thérapeutiques » de 1956 à Paris, commentent l'action protectrice de diverses drogues sur l'ulcère gastrique expérimental : Réglisse, Ipéca et *Ammi Visnaga* (khelline). Dans quelques essais personnels, ils obtiennent une protection complète chez 40 % de leurs animaux traités par la Réglisse. La technique utilisée est celle de SHAY, par ligature du pylore, chez le rat blanc.

En 1957, BERGER et HÖLLER (13) ont remarqué un parallélisme frappant entre l'intensité de coloration jaune de diverses solutions de sucres et leur activité antispasmodique. En se référant aux quelques travaux déjà publiés sur les flavonoïdes de la racine de Réglisse, y compris les nôtres, ils ont synthétisé la génine flavanonique et la génine chalconique des liquiritosides et se sont aperçus que l'une et l'autre exerçaient une action antispasmodique vis-à-vis de l'intestin isolé de lapin, la génine chalconique s'étant révélée deux fois plus active.

CHARPY et CASTELAIN (31) signalent de fréquentes réactions d'intolérance du sel de sodium de l'acide glycyrrhétique en applications externes comme anti-inflammatoire, aucune réaction semblable n'étant observée avec l'acide lui-même. En 1957, également, un extrait fluide de Réglisse est expérimenté, en Amérique, par SIMON et EDWARDS (129) en psychiatrie. En effet, dans divers syndromes psychiatriques, les auteurs, ayant noté une déficience corticosurrénale, ont eu l'idée d'administrer de l'extrait fluide de Réglisse à la dose de 2 à 10 ml par jour pendant 3 à 4 semaines. Celui-ci aurait eu une action tonique générale sur ces malades. Une étude plus vaste est envisagée : la Réglisse pourrait ainsi recevoir une nouvelle application dans le traitement des maladies mentales. Enfin BENIGNI (10) en 1958 étudie l'action bactériostatique de l'acide glycyrrhétique.

Malgré d'assez nombreux travaux bien des points restent à éclaircir : beaucoup d'essais ayant été effectués avec des préparations totales de Réglisse, on ne sait exactement à quel principe rapporter les effets observés. Beaucoup d'expériences seraient à reprendre avec des produits purs.

DEUXIÈME PARTIE

TRAVAUX PERSONNELS

CHAPITRE I

ESSAIS PRÉLIMINAIRES

Nous avons eu à notre disposition plusieurs échantillons de racines de provenances différentes et quelques suc commerciaux de Réglisse. La plupart de ces échantillons, en faible quantité, n'ont permis que des essais limités. Ces recherches commencées sur un échantillon de racine d'Iran, ont été continuées sur des lots homogènes de racines de Russie et de Turquie. *

I. — Humidité

L'humidité des divers échantillons grossièrement pulvérisés fut déterminée par simple dessiccation à l'étuve (24 heures à l'étuve à 37°, 24 heures à l'étuve à 60° et 1 à 2 heures à l'étuve à 100°, jusqu'à poids constant). Les teneurs en eau varient de 6 à 8 % pour les racines :

— racines entières	1) Espagne.....	7,99 %
	2) Grèce	7,72 %
	3) Irak	8,03 %
	4) Iran	7,87 %
	5) Italie	7,63 %
	6) France (Noirmou-	
	tier)	5,83 %

* Nous adressons ici nos sincères remerciements à tous ceux qui nous ont aimablement fourni des échantillons : notre Maître, le Professeur R. PARIS, le professeur Y. TUCKAKOV de Belgrade, Messieurs DARBONNE, HÉNON et RAVANBAZ, Mademoiselle CORNILLEAU, Monsieur G. COLOMB de DAUNANT des Etablissements CAR et Monsieur KREITMANN des Etablissements ZAN.

7) Russie	8,24 %
8) Syrie	7,28 %
9) Turquie	8,05 %

— racine décortiquée :

10) Yougoslavie	7,32 %
-----------------------	--------

et sont un peu plus élevées pour les suc :

1) Espagne	9,54 %
2) Italie	11,32 %
3) Turquie	11,72 %

II. — Cendres totales

1 à 2 g de racines broyées, après séchage à l'étuve à 100° jusqu'à poids constant, sont calcinés dans un creuset de quartz de diamètre = 70 mm. jusqu'à obtention de cendres blanches.

Les résultats pour les différents échantillons furent les suivants :

— racines entières	1) Espagne.....	4,49 %
	2) Grèce	6,10 %
	3) Irak	10,37 %
	4) Iran	5,08 %
	5) Italie	3,64 %
	6) France (Noirmou-	
	tier)	4,83 %
	7) Russie	5,61 %
	8) Syrie	4,41 %
	9) Turquie	4,07 %

— racine décortiquée :

10) Yougoslavie	3,10 %
-----------------------	--------

— suc :

1) Espagne.....	6,69 %
2) Italie	8,11 %
3) Turquie	7,81 %

III. Extraction par la méthode des solvants successifs

Echantillons n° 4 et n° 7.

Les extractions sont effectuées à chaud, dans l'appareil de Soxhlet. Le marc est mis à sécher entre chaque solvant.

Les solvants employés successivement sont : éther de pétrole, chloroforme, éther, acétate d'éthyle, acétate d'éthyle renfermant 10 % d'éthanol, acétone, alcool à 95°, alcool à 80° et eau.

1) EXTRAIT ÉTHÉRO-PÉTROLIQUE :

La liqueur jaune pâle est concentrée et portée à la glacière. Il s'y forme un dépôt grassex jaune. Après évaporation complète du solvant, il reste un produit gras, jaune foncé, d'odeur aromatique.

Rendement : racine n° 4 : 0,54 %
racine n° 7 : 0,91 %

La réaction de LIEBERMANN est nettement positive (stérols).

La recherche des caroténoïdes, par la réaction au trichlorure d'antimoine de CARR et PRICE, est négative, ainsi que celle des tanins par le chlorure ferrique et celle des quinones par addition de soude. Enfin la recherche des flavones est faite par la réaction dite de la cyanidine, à l'hydrogène naissant : on ajoute au résidu une solution alcoolique d'acide chlorhydrique et un morceau de tournure de magnésium (les flavones sont réduites en anthocyanes de coloration rouge). La réaction est négative sur le résidu qui semble donc constitué surtout par des lipides et des stérols.

2) EXTRAIT CHLOROFORMIQUE :

La liqueur est rouge foncé et, après concentration et repos à la glacière, ne donne pas de dépôt. Après élimination complète du solvant, on obtient un résidu sec, brun rouge, d'odeur aromatique, insipide.

Rendement : racine n° 4 : 3,51 %
racine n° 7 : 2,86 %

La réaction de LIEBERMANN est légèrement positive.

Le résidu semble essentiellement constitué de résines accompagnées de traces de stérols.

3) EXTRAIT ÉTHÉRÉ :

Les liqueurs brun clair donnent, après évaporation du solvant, un résidu brun rougeâtre, d'odeur aromatique, sans saveur.

Rendement : racine n° 4 : 0,19 %
racine n° 7 : 0,32 %

La réaction de la cyanidine faiblement positive dans les deux cas indique la présence de traces de dérivés flavoniques.

4) EXTRAIT ACÉTATE D'ÉTHYLE :

Les liqueurs brun doré, concentrées une première fois, fournissent, après repos au frigidaire, un précipité floconneux gris jaunâtre. Une seconde concentration des liqueurs-mères permet de séparer un nouveau dépôt, de teinte plus foncée. Ces précipités sont recueillis par centrifugation et portés immédiatement sous vide phosphorique jusqu'à complète dessiccation. Ils se résinifient très vite au simple contact de l'air.

Rendement : racine n° 4 : 0,40 %
 racine n° 7 : 0,85 %

Avec le perchlorure de fer, ces substances donnent une coloration vert foncé ; avec la soude, une teinte jaune citron : par action de l'hydrogène naissant (réaction de la cyanidine), une coloration rose, prouvant la présence de dérivés flavoniques.

5) EXTRAIT ACÉTATE D'ÉTHYLE ADDITIONNÉ DE 10 % D'ÉTHANOL :

Liqueurs jaune doré. Après concentration au demi sous-pression réduite et repos au frigidaire, il apparaît un beau précipité jaune. Celui-ci est recueilli par centrifugation et porté sous vide avec les mêmes précautions que précédemment. Une deuxième concentration est effectuée, amenant une nouvelle précipitation.

Rendement : racine n° 4 : 0,97 %
 racine n° 7 : 1,72 %

La réaction de la cyanidine, rouge vif, montre une teneur élevée en dérivés flavoniques. La présence de principes réducteurs est également mise en évidence par réduction de la liqueur de FEHLING.

6) EXTRAIT ACÉTONIQUE :

Les solutions, jaune pâle, après concentration au demi ne donnent aucun précipité. Après concentration à sec, on obtient un résidu brunâtre qui ne présente qu'une coloration rose pâle par la réaction de la cyanidine.

Rendement : racine n° 4 : 0,26 %
 racine n° 7 : 0,42 %

7) EXTRAIT ALCOOLIQUE :

Nous avons épuisé d'abord par l'alcool à 95°, ensuite par l'alcool à 80°. Les liqueurs présentent sensiblement les mêmes caractères : brunes, de saveur sucrée, elles deviennent sirupeuses après concentration. Leur

évaporation à sec fournit un résidu brun, très sucré, ne donnant qu'une coloration rose pâle par la réaction de la cyanidine, réduisant la liqueur de FEHLING.

Rendement : racine n° 4 :

alcool 95° : 10,53 %

alcool 80° : 3,52 %

8) EXTRAIT AQUEUX :

Les solutions aqueuses, brunes, moussent abondamment. L'extrait sec est brun foncé, très sucré et donne par agitation avec de l'eau une mousse abondante due à la présence de la glycyrrhizine.

En résumé, par cette méthode, ont été mis en évidence :

— des stérols dans l'extrait éthéro-pétrolique et dans l'extrait chloroformique ;

— des résines dans l'extrait chloroformique ;

— des dérivés flavoniques : abondants dans l'extrait d'acétate d'éthyle et surtout d'acétate d'éthyle additionné d'alcool, ils existent encore dans les extraits alcooliques ;

— de la glycyrrhizine dans l'extrait alcoolique et surtout l'extrait aqueux.

Nous avons en outre essayé, à la suite de ces investigations préliminaires, quelques autres mélanges de solvants tels que : acétate d'éthyle additionné de 5 % d'éthanol, de 5 à 10 % de méthanol, enfin le méthanol seul. Ces essais ont permis d'effectuer des extractions sur de plus grandes quantités de racines et d'étudier les dérivés flavoniques (voir p. 61).

Enfin, pour l'étude des œstrogènes, nous avons préparé un extrait dit délipidé dont le test d'ALLEN et DOISY est négatif (voir p. 134) : les stérols en étaient éliminés par une extraction éthéro-pétrolique et les résines par une extraction chloroformique : le marc était traité ensuite par l'éthanol. Ces liqueurs alcooliques ont permis une étude des oses.

IV. — Oses

600 g de racines n° 9 ont été épuisés à chaud dans l'appareil de Soxhlet, successivement par l'éther de pétrole puis par le chloroforme : le marc, séché a été épuisé par lixiviation à froid à l'aide d'alcool éthylique. Les colatures sont jaune foncé : après concentration et repos pendant trois

jours, on observe un fin précipité cristallin au fond du flacon. Ce précipité se sédimente difficilement par centrifugation. Examiné au microscope, il apparaît cristallisé en fines aiguilles. Le flacon est alors laissé au repos pendant trois semaines. Les cristaux grossissent lentement sur les parois et prennent une forme cubique. Ils sont alors facilement recueillis et lavés avec quelques ml d'alcool.

Redissous dans de l'alcool méthylique bouillant, la solution est filtrée sur noir animal puis concentrée. Après repos, nous avons obtenu de très beaux cristaux cubiques, parfaitement blancs. 600 g de plante ont fourni 6,90 g de cristaux, soit un rendement de 1,15 %.

Ces cristaux ont une saveur sucrée nette, sont solubles dans l'eau. Leur point de fusion (bloc Maquenne) est 187°. La liqueur de FEHLING n'est pas réduite, mais elle l'est après hydrolyse acide. Enfin, en solution à 1 % dans l'alcool à 60°, le pouvoir rotatoire est dextrogyre et égal à $+ 1^{\circ}18'$, correspondant à un pouvoir rotatoire spécifique de $+ 65^{\circ}$.

Ces propriétés correspondent à celles du saccharose.

Ces essais préliminaires nous ont donc permis d'orienter les recherches portant sur certains constituants de la racine de Réglisse :

— les dérivés flavoniques peuvent être extraits par l'acétate d'éthyle pur ou additionné d'alcool ;

— les substances œstrogènes devront être recherchées avec les stérols dans les extraits éthéro-pétroliques et chloroformiques.

Enfin, l'extraction de la glycyrrhizine, substance bien connue, n'a pas été envisagée dans ce travail, mais par contre, une étude comparée des diverses méthodes de dosage proposées pour cette substance a été effectuée.

CHAPITRE II

ÉTUDE DES FLAVONOÏDES

A. -- Extraction des dérivés flavoniques totaux

I. — A partir de la plante fraîche.

Pour tenter d'extraire les dérivés flavoniques à partir de la plante fraîche, nous avons eu à notre disposition quatre échantillons de racines, d'origine différente et parfois à des stades de dessiccation déjà assez avancés, car la matière première fraîche est extrêmement difficile à obtenir.

a) *Régliasse fraîche de la Faculté de Pharmacie de Paris* (Jardin botanique) :

C'est le premier essai qui a été effectué. Ont été stabilisés puis traités par la méthode de CHARAUX-PARIS (102) :

— d'une part, 300 g de racines fraîches coupées en morceaux, par 3 litres d'alcool à 96° bouillant, l'ébullition étant poursuivie pendant 20 minutes. Un deuxième épaisissement de la drogue séchée et broyée est effectué dans le même alcool pendant 30 minutes à l'ébullition.

— d'autre part, 600 g de feuilles et tiges, également coupées, ont été stabilisés par 6 litres d'alcool à 96° bouillant, puis épuisés comme précédemment.

Les liquides de stabilisation, concentrés séparément sous pression réduite, sont laissés au repos. Après une semaine aucun précipité ne s'étant formé, on concentre à sec et reprend immédiatement par l'eau bouillante. La liqueur aqueuse, additionnée d'une couche d'éther, est laissée au repos plusieurs semaines dans le réfrigérateur. Il n'apparaît que quelques flocons à la surface de séparation des deux liquides.

Cependant la présence des dérivés flavoniques dans les solutions aqueuses est vérifiée par la réaction de la cyanidine. On obtient une coloration :

- rouge violacé, fortement positive, avec l'extrait des racines ;
- jaunâtre, faible, avec l'extrait des feuilles et tiges.

En conclusion, les dérivés flavoniques semblent bien essentiellement localisés dans les racines, mais le procédé n'a pas donné de bons résultats avec l'échantillon traité.

b) *Régisse fraîche décortiquée de Yougoslavie :*

Nous avons eu 400 g de racine décortiquée demi-fraîche. Les racines coupées sont stabilisées dans 2 litres d'alcool à 96° bouillant pendant 20 minutes. On filtre le liquide encore chaud et les racines sont mises à sécher. Elles sont ensuite finement pulvérisées et épuisées une seconde fois pendant 20 minutes par le même alcool. On filtre chaud.

La colature obtenue est limpide, jaune d'or intense et donne une réaction de la cyanidine rouge violacé. Par refroidissement un trouble apparaît.

La réaction de la cyanidine est encore positive sur le marc séché ce qui montre que les dérivés flavoniques n'ont pas été extraits totalement. Des essais de séparation ont donc été effectués d'une part sur la colature, d'autre part sur le marc.

1) *Colature.* — On distille sous pression réduite et à une température inférieure à 50° jusqu'au volume final de 200 ml.

Après deux semaines de repos à la glacière, un précipité d'un jaune gris est séparé qui, après dessiccation sous vide, est pesé. Nous obtenons 1 g d'un produit présentant une réaction de la cyanidine assez faible.

Les eaux-mères concentrées à 50 ml deviennent de plus en plus foncées. Par refroidissement elles se troublent mais ne donnent naissance à aucun précipité.

Enfin les liqueurs sont évaporées à sec. Le résidu brun, résinié, est repris par l'eau bouillante. La liqueur jaune foncé et trouble est filtrée sur coton et finalement agitée, tiède encore, dans une ampoule à décanter avec un peu d'éther. Les deux couches sont transvasées dans un flacon qui est placé à la glacière. Plusieurs semaines après, il ne s'est formé, à la surface de séparation des deux liquides, qu'une pellicule floconneuse.

Aucun produit n'a donc pu être extrait de cet échantillon. Par ailleurs, nous avons remarqué que les racines décortiquées donnent des liqueurs beaucoup plus limpides et moins chargées en résines que les racines entières.

2) *Le marc.* — Il est séché et traité à reflux pendant une heure par 1.600 ml d'alcool méthylique. Le nouveau marc est soumis à la presse à chaud et les liquides filtrés sont réunis. On obtient une liqueur jaune foncé (cyanidine rose, peu intense). Cette solution, concentrée sous pression réduite à 100 ml donne un liquide sirupeux brun clair avec de légers

flocons jaunes : après repos à la glacière, quelques cristaux se déposent enserrés dans une gangue visqueuse dont il est impossible de les séparer.

Après décantation et nouvelle concentration, il est possible de séparer dans les eaux-mères un précipité blanc ivoire, cristallisé en fines aiguilles. Celles-ci sont recueillies sur filtre de verre fritté, lavées avec quelques gouttes de méthanol et séchées sous vide (0,02 g).

Il ne s'agit pas d'un dérivé flavonique car la réaction de la cyanidine est négative sur cette substance.

En outre, ce produit chauffé sur lame de nickel laisse un résidu minéral. Il n'a pas été identifié.

c) *Racine fraîche d'Espagne* :

500 g de racines entières fraîches ont été divisées en 2 lots qui furent traités séparément :

— 250 g de racines sont stabilisés 20 minutes dans de l'alcool éthylique à 96° bouillant. Les racines séchées, puis broyées, sont traitées par le même alcool pendant 30 minutes à l'ébullition. Le marc est pressé, les jus filtrés chauds. Le liquide obtenu est brun, limpide (cyanidine positive, virant rapidement à l'orange). Par concentrations successives, la liqueur, de saveur sucrée, brunit, devient de moins en moins limpide, mais il ne se produit aucune précipitation de flavones.

— 250 g sont soumis à un traitement identique en remplaçant l'alcool éthylique par l'alcool méthylique. La liqueur est brun-clair, légèrement trouble. La réaction de la cyanidine est positive, virant à l'orange. Après concentration, on obtient un liquide sirupeux brun, à saveur sucrée de glycyrrhizine et moussant abondamment. Aucun précipité flavonique ne se sépare.

d) *Racine fraîche de Camargue* :

Ce lot, de 800 g de racines fraîches, est soumis aux différents essais suivants :

1. *Racines entières*. — 300 g de racines entières sont stabilisés par l'alcool éthylique bouillant selon le procédé habituel. Le liquide obtenu est brun-rouge et donne par refroidissement un dépôt gris jaunâtre qu'il est impossible de recueillir et de sécher. Sur ce résidu présentant la saveur sucrée de la glycyrrhizine, la réaction de la cyanidine est très faible. Il s'agit probablement d'un glycyrrhizate. Les eaux-mères concentrées n'ont pas donné d'autre précipité.

— 300 g de racines entières sont traités à froid par lixiviation par de l'alcool éthylique. Les racines coupées sont mises à macérer 24 heures

dans un lixiviateur avec 700 ml d'alcool à 95°. Un litre d'alcool est encore nécessaire pour terminer l'extraction qui dure trois jours. On obtient un liquide brun rouge. Les racines séchées sont broyées et soumises à une nouvelle lixiviation. Les liquides réunis donnent la réaction de la cyanidine (coloration faible et orangée). Par concentration on ne sépare aucun précipité notable.

2. *Racines décortiquées.* — 120 g de racines décortiquées sont stabilisés dans 600 ml d'alcool à 95° bouillant selon la technique habituelle. On obtient un liquide jaune clair, limpide, présentant une réaction de la cyanidine positive mais peu intense.

Par concentrations successives, il se forme un précipité jaune très pâle qui, centrifugé et séché sous vide, prend une consistance huileuse. Il est repris par quelques gouttes d'alcool : après évaporation, un résidu huileux jaune pâle est obtenu, présentant une réaction de LIEBERMANN d'un vert très intense.

Il s'agit donc d'un phytostérol.

Aucun dérivé flavonique n'a pu être isolé malgré leur mise en évidence dans les liqueurs par la réaction de la cyanidine.

3. *Ecorces.* — 80 g d'écorces des racines précédentes sont stabilisés dans 400 ml d'alcool bouillant et traités comme il a déjà été dit. On a finalement un liquide brun rouge qui donne par refroidissement un dépôt jaunâtre. Celui-ci est recueilli par centrifugation, séché sous vide. C'est une poudre gris jaune de saveur sucrée intense, fondant vers 260° (bloc Maquenne) (cyanidine sensiblement nulle). Il est soluble dans l'alcool dilué chaud et l'eau chaude et laisse un résidu minéral après calcination. Il s'agit d'un glycyrrhizate. Les eaux-mères ne présentent pas la réaction de la cyanidine. Elles sont concentrées au demi. Après repos il se forme un précipité qui, après dessiccation, reste huileux et donne une réaction de LIEBERMANN très intense (stérol).

On concentre de nouveau et on dilue avec un égal volume d'eau. Il apparaît un trouble qui, après repos, ne donne qu'une résine noirâtre, soluble dans le chloroforme.

Au cours de ces essais sur la racine, fraîche, entière ou décortiquée, nous n'avons donc pu isoler de dérivés flavoniques, même à l'état brut. Nous sommes seulement parvenue à préciser leur localisation dans la plante :

— en très petite quantité dans les tiges et feuilles ;

— plus abondamment dans les racines entières et surtout dans le bois, l'écorce étant nettement moins riche.

D'autre part, nous avons mis en évidence :

- dans la racine décortiquée, une substance à l'état de sel minéral, qui n'a pas été identifiée ;
- dans la racine décortiquée et les écorces, la présence de stérols ;
- dans les écorces de racines et les racines entières, la présence de glycyrrhizate alcalin et de résines.

Ces échecs successifs nous ont amenée à rechercher un autre mode de séparation des dérivés flavoniques. Les racines sèches du commerce constituent une matière première abondante permettant d'effectuer un grand nombre d'essais dont certains ont donné des résultats satisfaisants.

II. — A partir de la plante sèche.

La présence d'une flavanone, appelée liquiritine, dans la racine de Réglisse a déjà été signalée, nous l'avons vu, en 1931 par FUJITA et TSUDA. En 1934, d'autres auteurs japonais, SHINODA et UEEDA, l'isolent et en étudient la structure. Depuis cette époque, plusieurs auteurs, et en particulier WIEST en 1949, ont tenté de préparer cette substance mais n'ont obtenu que des produits résineux.

Nous avons donc tout d'abord essayé de reprendre la méthode de préparation de SHINODA et UEEDA (128). N'ayant pu séparer de substance cristalline par leur méthode, nous avons alors épuisé un même lot de racine de Réglisse par des solvants successifs. La réaction de la cyanidine nous a guidée pour séparer les fractions riches en principes flavoniques. Une méthode d'extraction des flavones brutes a pu être ainsi mise au point et a fait l'objet d'une communication préliminaire (106). Les réactions colorées de la substance brute obtenue nous ont fait présumer de la coexistence de deux corps de la série des flavonoïdes : une flavanone, responsable de la coloration violacée sous l'influence de l'hydrogène naissant ; une chalcone, d'autre part, responsable de la coloration jaune fluorescent obtenue par la réaction citro-borique de WILSON (148). Mais si l'extraction de ces composés fut délicate du fait de leur facile résinification, leur fractionnement n'en fut pas moins long. Et c'est au cours de ces recherches que nous avons eu connaissance d'un travail, publié en 1954 par PURI et SESHADRI (117) signalant, eux aussi, l'existence d'un dérivé chalconique à côté d'une flavanone. Nous avons tenté de reproduire la technique indiquée par ces auteurs, mais sans succès et avons dû la modifier avant d'extraire des produits satisfaisants.

1. PROCÉDÉ DE SHINODA ET UEEDA (128) :

D'après ces auteurs, les racines de Réglisse (*Glycyrrhiza glabra*) broyées sont épuisées à plusieurs reprises par du méthanol. Ils ne précisent pas s'il s'agit d'une extraction au Soxhlet par l'alcool bouillant, ou d'une lixiviation à froid.

Nous avons effectué ces deux essais séparément, sans obtenir de meilleurs résultats dans l'un ou l'autre cas. Les auteurs japonais disent que, après concentration et par simple repos, des aiguilles cristallisées se séparent, en même temps qu'une faible quantité de résine. Personnellement, par concentration, nous avons obtenu des liqueurs de plus en plus sirupeuses, mais sans aucune apparition de cristaux. Un produit résineux se dépose sur les parois du flacon. Les liqueurs sont alors décantées et traitées à froid par de l'acide sulfurique à 50 % dans la proportion indiquée par SHINODA (400 à 800 g par kg de matière première). Il se sépare une résine noirâtre abondante. Mais par repos à la glacière le filtrat ne donne aucun dépôt cristallisé. La résine a été reprise par de l'eau distillée et portée à ébullition sans qu'il soit obtenu de dépôt cristallisé par refroidissement.

A noter que WIEST (147) a rencontré les mêmes écueils et n'a obtenu que des substances résinifiées.

Nous avons alors pratiqué à chaud, dans un appareil de Soxhlet, la méthode d'épuisement par des solvants successifs qui a donné des résultats encourageants ; nous avons ensuite procédé à froid par lixiviation.

2. EXTRACTION A CHAUD DANS L'APPAREIL DE SOXHLET :

350 g de racine de Réglisse, non décortiquée et réduite en poudre grossière sont épuisés dans un appareil de Soxhlet, d'abord par une série de solvants organiques, puis par l'eau. Chacune de ces extractions dure environ six heures.

Les résultats obtenus par cette méthode ont déjà été décrits en détails (voir Essais préliminaires). Ne seront étudiées ici que les liqueurs extractives présentant une réaction de la cyanidine positive (acétate d'éthyle, acétate d'éthyle additionné de 5 % de méthanol, méthanol pur).

Extraction par l'acétate d'éthyle :

Le liquide recueilli est jaune foncé, presque brun, limpide même après refroidissement. Il est alors concentré sous pression réduite et à une température inférieure à 50°, une première fois à moitié environ du volume initial. Il apparaît un précipité floconneux brun. Après repos, ce dernier

est recueilli par centrifugation et mis à sécher sous vide immédiatement car il se résinifie très vite au contact de l'air. Les eaux-mères présentent une réaction de la cyanidine positive, de même d'ailleurs que ce premier précipité.

Une seconde concentration suivie de repos à la glacière permet de recueillir un nouveau dépôt floconneux jaune ocre qui est centrifugé et desséché sous vide phosphorique aussi rapidement que possible. Il présente une réaction de la cyanidine positive.

Les eaux-mères concentrées une troisième fois laissent déposer un précipité jaune franc : on le recueille et le sèche de la même manière que précédemment.

Chaque précipité, après dessiccation sous vide phosphorique est rapidement pulvérisé au mortier et conservé dans des tubes bien bouchés. Le rendement total est d'environ 0,50 %.

Extraction par l'acétate d'éthyle + 5 % de méthanol :

La poudre de Réglisse provenant de l'extraction précédente est mise à sécher avant d'être de nouveau épuisée au Soxhlet par le mélange acétate d'éthyle - 5 % de méthanol. On obtient une solution jaune foncé, limpide à chaud, qui se trouble par refroidissement. Le lendemain le fond du récipient est tapissé de flocons bruns qui, séparés, essorés, ne donnent qu'une réaction de la cyanidine faible et de plus se résinifient très vite.

La solution est alors concentrée jusqu'à début de précipitation. La réaction de la cyanidine est fortement positive (teinte violacée). Après repos, nous recueillons rapidement par centrifugation une première fraction de flocons jaune clair, séchés et conservés avec les précautions habituelles.

Le filtrat concentré laisse déposer un autre précipité jaune, donnant, après dessiccation, une poudre d'un beau jaune et présentant une réaction de la cyanidine fortement positive (rouge violacé).

Le rendement total en dérivés flavoniques est d'environ 0,50 %.

Extraction par l'alcool méthylique :

La poudre de Réglisse ainsi traitée, puis séchée, est alors soumise à un épuisement par le méthanol. La colature obtenue est jaune brun, limpide à chaud ; par refroidissement les parois du ballon sont tapissées d'un fin précipité très adhérent et presque blanc qui ne peut-être recueilli.

La solution donne une réaction de la cyanidine rouge, fortement positive. Elle possède également la saveur sucrée caractéristique de la glycyrrhizine.

Concentré, ce liquide devient de plus en plus sirupeux, sans qu'il soit possible d'en séparer de précipité floconneux. La concentration est donc poursuivie jusqu'à obtention d'un extrait mou, brun noirâtre, présentant une réaction de la cyanidine très intense et possédant une saveur sucrée prononcée. Cet extrait mou, en solution aqueuse, mousse abondamment. Il est probable qu'il renferme, à côté des flavones, de la glycyrrhizine. Afin de ne dissoudre que les seuls dérivés flavoniques, cet extrait est traité à plusieurs reprises par 100 ml du mélange acétate d'éthyle renfermant 5 % de méthanol, à l'ébullition à reflux pendant 1 heure 1/2.

Le premier liquide d'épuisement est jaune pâle (réaction de la cyanidine faible). A la seconde reprise, le liquide est jaune citron (réaction de la cyanidine violette). De la troisième à la douzième reprises à reflux les solutions obtenues sont très jaunes et présentent des réactions de la cyanidine d'un rouge franc. Ensuite la coloration des liqueurs et l'intensité de la réaction décroissent. Il a été effectué jusqu'à seize épuisements.

Les différentes fractions qui présentent une réaction de la cyanidine intense, sont réunies et soumises à des concentrations successives. Finalement est séparée une poudre jaune clair qui, après dessiccation, se conserve bien (cyanidine rose violacé). Le rendement total en dérivés flavoniques est de 0,65 %.

Cette méthode permet donc d'obtenir des dérivés flavoniques bruts, non résinifiés, en quantité notable, donnant une coloration rouge intense par la réaction de la cyanidine et jaune fluorescent par la réaction citroborique de WILSON. Nous avons alors songé à procéder à froid par lixiviation afin d'abrégier un peu la technique et de la rendre applicable à des quantités plus importantes de plante.

3. EXTRACTION A FROID PAR LIXIVIATION :

Nous utilisons toujours la racine entière n° 7 broyée grossièrement. Plusieurs lots ont été traités différemment et les résultats ont été comparés. Le principe de la technique à froid est identique à celui des extractions à chaud : d'abord dégraisser la poudre et la débarrasser de ses résines, extraire ensuite les dérivés flavoniques.

Essai n° 1 : 250 g de poudre sont mis à macérer 24 heures dans du chloroforme. On procède à la lixiviation et on recueille deux litres de liqueur colorée en brun rouge foncé. Après concentration il apparaît seulement un léger précipité jaune verdâtre. Le liquide ne donne pas la

réaction de la cyanidine. La poudre de Réglisse est séchée, puis épuisée par de l'acétate d'éthyle renfermant 10 % de méthanol. Le liquide est brun foncé, à reflets rougeâtres. Une première concentration donne un précipité jaune gris. La seconde, un précipité plus jaune. La réaction de la cyanidine sur chacun d'eux est positive. Le rendement est de 0,74 %.

— La même poudre préalablement séchée est alors épuisée par du méthanol. Les colatures, colorées en jaune foncé, laissent déposer à froid de très petites particules jaunes. Au cours de la concentration le liquide se trouble. Le dépôt gris jaunâtre recueilli après repos ne donne pas la réaction de la cyanidine. Les eaux-mères la donnent intensément. Après concentration à l'état d'extrait mou, l'extraction des dérivés flavoniques est effectuée par reprises à reflux successives, d'une heure chacune, à l'aide d'acétate d'éthyle renfermant 5 % de méthanol. Les liqueurs réunies et concentrées sous pression réduite fournissent une poudre jaune assez foncé présentant une réaction de la cyanidine fortement positive. Le rendement est de 0,36 %.

Essai n° 2 : 250 g de poudre sont mis à macérer dans le lixiviateur pendant 24 heures avec 2 l 500 de benzène. Les liqueurs benzéniques, colorées en jaune brun, sont concentrées. On ne sépare aucun précipité (réaction de la cyanidine nulle). On conserve les liqueurs qui, concentrées, ont pris la teinte rouge noirâtre des solutions chloroformiques précédentes.

Le marc séché est alors soumis à une lixiviation par le chloroforme (10 fois le poids de plante). Les solutions chloroformiques sont rougeâtres (cyanidine : nulle) : elles sont conservées après concentration et seront étudiées plus loin (voir p. 134). Un dépôt rougeâtre est apparu au bout de quelques temps.

Le marc séché est ensuite soumis à la lixiviation par l'acétate d'éthyle + 10 % d'éthanol. Les liqueurs, colorées en jaune ambré, présentent une réaction de la cyanidine positive. Après concentration sous pression réduite et repos on peut recueillir un précipité jaune foncé que l'on sèche (rendement : 1,32 %).

Le marc, séché, est encore lixivié par de l'alcool éthylique. Par simple repos de ces liqueurs alcooliques il apparaît dans le récipient un dépôt de minuscules grains cristallisés incolores. Il s'agit probablement de saccharose déjà isolé par ailleurs. Les colatures, qui présentent une réaction de la cyanidine fortement positive, sont alors concentrées à l'état d'extrait mou qui est ensuite repris à reflux par un mélange d'acétate

d'éthyle à 5 % d'éthanol tant que ce solvant enlève des dérivés flavoniques. Les diverses liqueurs d'épuisement sont réunies et concentrées. Elles permettent de recueillir un beau précipité flavonique jaune (rendement 1,30 %).

CONCLUSION

La lixiviation, méthode simple, permet donc d'obtenir les dérivés flavoniques de la racine de Réglisse avec un rendement égal ou supérieur à celui obtenu par épuisements à chaud dans l'appareil de Soxhlet. Le traitement préalable par le benzène, puis par le chloroforme, s'avère nécessaire car il débarrasse la drogue de nombreuses impuretés. D'autre part, l'alcool éthylique doit être préféré à l'alcool méthylique pour la lixiviation car il permet d'obtenir des produits plus purs et un meilleur rendement.

De toutes manières, les extractions à froid par lixiviation ou à chaud dans l'appareil de Soxhlet sont toujours très longues et nécessitent ensuite de multiples épuisements à reflux des extraits obtenus, par l'acétate d'éthyle additionné de 5 % d'alcool. Il faut remarquer d'ailleurs que les flavones ne sont pas intégralement extraites car le marc présente encore une réaction de la cyanidine positive.

4. PROCÉDÉ DE PURI ET SESHADRI (117) :

Ces auteurs signalent la présence, dans la racine de Réglisse, de deux glucosides, l'un de structure flavanonique : la liquiritine, l'autre, isomère, de forme chalconique, qu'ils nomment iso-liquiritine.

Avant d'exposer l'étude chimique de ces substances, ces auteurs en donnent un procédé d'extraction valable pour les racines fraîches ou sèches. Cette nouvelle technique a été expérimentée dès que nous en avons eu connaissance.

Les racines sèches broyées sont lixivées à froid par de l'alcool éthylique. Les liqueurs alcooliques sont ensuite concentrées à faible volume et versées dans un excès d'eau. Il se forme à ce moment un précipité très abondant, noirâtre et se résinifiant rapidement. On extrait à l'éther. Le précipité s'y redissout et l'on obtient une couche éthérée noire et une couche aqueuse jaune. Cette solution aqueuse contient, à côté des pigments flavoniques, des sucres et d'autres composés hydrosolubles. On la traite alors par une solution à 20 % d'acétate neutre de plomb. Il apparaît un précipité jaune sale peu abondant. Après séparation de ce précipité, le filtrat est additionné de solution d'acétate basique de plomb à 30 %. On recueille un abondant précipité jaune d'or qui est remis en suspension dans de l'alcool aqueux (2 volumes d'alcool pour 1 volume d'eau) et décomposé

par l'hydrogène sulfuré. Les dérivés flavoniques repassent en solution. Celle-ci renfermant des particules non dissociées, le précipité de sulfure de plomb est soumis de nouveau au même traitement. Finalement les filtrats sont concentrés à température ordinaire et en présence de potasse.

Les auteurs hindous observent une première séparation de cristaux jaune pâle, en petite quantité. Après recristallisation dans l'eau chaude, ils obtiennent des aiguilles incolores fondant à 211° - 212° (point de fusion indiqué par SHINODA et UEDA) et donnant une réaction de la cyanidine intense (forme flavanonique).

Les solutions mères, après concentration, donnent un dépôt jaune foncé plus abondant. La substance cristallise dans l'alcool dilué sous forme d'aiguilles prismatiques jaune foncé fondant à 185° - 186° et ne donne pas la réaction de la cyanidine. Ces aiguilles correspondent à la forme chalconique, ou iso-liquiritoside.

Au cours d'essais personnels nous n'avons pas réussi à recueillir les deux formes cristallisées ci-dessus nommées. Les solutions hydro-alcooliques présentent, certes, une réaction de la cyanidine très positive. Mais elles renferment d'importantes quantités de sucres, et, concentrées, prennent une consistance sirupeuse. Tout au plus avons-nous observé, dans une solution ainsi concentrée et conservée depuis plus de quatre mois, l'apparition au fond du flacon de quelques petites aiguilles brillantes, impossibles à recueillir.

Toutes ces solutions ont été conservées afin d'en tenter la purification ultérieure par chromatographie sur colonne (voir p. 57).

CONCLUSION

Il ressort de ces investigations que l'extraction des dérivés flavoniques de la racine de Réglisse fraîche ou sèche est longue et délicate. L'épuisement par les solvants successifs, à froid ou à chaud, a permis de préparer une quantité notable de dérivés flavoniques bruts, à l'état pulvérulent, alors que la méthode par défécation plombique préconisée par PURI et SESHADRI n'a donné qu'une solution très concentrée en dérivés flavoniques. Les produits bruts ainsi séparés ont été fractionnés par chromatographie sur colonne.

B. — Fractionnement des flavonoïdes totaux

Les produits flavoniques bruts obtenus par les différents procédés décrits précédemment sont souillés d'impuretés diverses (traces de

matières grasses, résines, sucres, etc...). Les poudres sont colorées en jaune grisâtre ou jaune plus ou moins foncé. Elles présentent une réaction de la cyanidine positive mais leur point de fusion est inconstant, peu net, et leur conservation sous vide est nécessaire car elles s'oxydent et se résinifient rapidement au contact de l'air et de traces d'humidité. Différentes méthodes de purification ont été essayées, la détermination des points de fusion, les réactions colorées et la chromatographie sur papier permettant de contrôler la pureté des substances obtenues.

Celles-ci se résinifiant très facilement au contact de la moindre trace d'eau, nous avons rencontré de notables difficultés au cours des manipulations.

1. - Epuisement par différents solvants dans un micro-Kumagawa.

La substance est placée dans une petite allonge, genre Kumagawa. La vapeur du solvant se condense à la partie supérieure de l'appareil et la substance se trouve lixiviée à chaud.

a) *Epuisement par l'acétate d'éthyle :*

Un gramme de substance brute est extrait par l'acétate d'éthyle pur à ébullition pendant huit heures.

Dans le liquide d'extraction coloré en jaune citron il se forme par refroidissement un beau précipité jaune clair. Après avoir laissé reposer pendant 48 heures, le précipité est recueilli par centrifugation, lavé par quelques ml d'acétate d'éthyle, enfin mis à sécher sous vide. Les liqueurs-mères concentrées fournissent un second précipité, réuni au premier. Nous obtenons 0,30 g d'un produit pulvérulent, jaune clair, dont le point de fusion (bloc Maquenne) se situe entre 136° et 140°. La réaction de la cyanidine est rose violacé intense. Il s'agit donc d'une flavanone.

Dans la nacelle reste un dépôt brunâtre, partiellement résinifié (cyanidine orangée).

b) *Epuisement par l'éther pur :*

Dans l'éther coloré en jaune après épuisement de la substance brute se sépare un produit jaune soufre qui est recueilli par centrifugation, lavé à l'éther et séché sous vide. Il fond à 134°-135° mais la réaction de la cyanidine est peu intense. En outre, bien que placé en tube fermé, au bout de 24 heures, il s'est partiellement résinifié.

Dans la nacelle est resté un produit jaune assez clair, de point de fusion identique mais présentant une réaction de la cyanidine beaucoup plus intense.

Ces essais de purification, bien qu'encourageants, donnent encore des résultats inconstants. Nous avons alors décidé d'utiliser la chromatographie sur colonne, technique beaucoup plus longue mais qui a permis d'obtenir un meilleur fractionnement dans des conditions bien déterminées.

II. — Chromatographie d'adsorption sur colonne.

La chromatographie sur colonne ayant parfois donné de bons résultats pour la séparation des flavones, nous avons appliqué cette méthode, aux produits bruts provenant des extractions par les solvants organiques.

Différents adsorbants ont été utilisés et ont donné des résultats variables. Tous les solvants ont été soigneusement purifiés par distillation avant leur emploi.

a) Colonne de cellulose anhydre :

Nous avons essayé en premier lieu la cellulose anhydre DURIEUX.

Un tube de verre Pyrex, de 17 cm. de haut et 13 mm. de diamètre et terminé par un robinet, est rempli aux deux tiers environ avec 8 grammes de cellulose. Une solution de 0.30 g de substance brute dans 10 ml d'acétate d'éthyle pur est versée sur la colonne qui s'imbibe lentement.

Les solvants d'élution sont recueillis par fractions de 5 ml, les résidus d'évaporation étant étudiés séparément.

Ont été successivement utilisés :

— éther de pétrole : 25 ml ;

— chloroforme R. P. pour analyse : 25 ml ;

— éther éthylique pur : 20 ml ;

— acétate d'éthyle pur : 75 ml ;

— acétate d'éthyle pur renfermant 5 % d'alcool méthylique pur : 10 ml ;

— acétate d'éthyle pur renfermant 10 % d'alcool méthylique pur : 25 ml.

Pour plus de clarté les fractions sont numérotées et les résultats exprimés ci-dessous sous forme de tableau :

Fractions	Solvant	Coloration	Cyanidine	Nature de la substance élue
1 à 5	Ether de pétrole	jaune pâle	0	matières grasses
6 à 10	Chloroforme	incolore	0	matières grasses
11 à 14	Ether éthylique	incolore	0	0
15 à 16	Acétate éthyle	0	0	0
17 à 29	Acétate éthyle	jaune	rose	flavanone
30 à 31	Acétate éthyle	jaune pâle	$\neq 0$	$\neq 0$
32 à 49	+ 5 % méthanol id.	jaune vif	+ rose	flavanone
50 à 51	Acétate éthyle	jaune	+ violacé	flavanone
52 à 54	+ 10 % méthanol id.	jaune pâle	faible	$\neq 0$

Les fractions les plus intéressantes sont donc celles éluées par l'acétate d'éthyle et par l'acétate d'éthyle renfermant 5 % d'alcool méthylique. Les résidus recueillis après évaporation sont réunis et repris par le minimum de solvant correspondant. Les solutions obtenues sont concentrées jusqu'à début de précipitation et laissées au repos au frigidaire. Il se forme un fin précipité jaune clair très hygroscopique qui colle aux parois du récipient.

Une grande partie du produit brut reste sur la colonne, résinifié.

b) Colonne de Magnésol :

Le Magnésol est un silicate de magnésium activé. La technique est la même que précédemment : élution par une série de solvants purs et étude des fractions recueillies.

En outre, comme l'expérience précédente a montré que le produit obtenu était particulièrement hygroscopique, nous avons desséché colonne et adsorbant pendant 24 heures à l'étuve à 100° avant de les utiliser.

Essai n° 1 : Un tube en verre Pyrex, de 35 cm de haut et 18 mm de diamètre et terminé par un robinet, renferme de bas en haut :

- 1 cm de laine de verre ;
- 22 g de Magnésol ;
- 1 cm de laine de verre ;
- 0,50 g de substance brute en poudre ;
- 1 cm de laine de verre.

Les solvants d'élution sont recueillis par fractions de 10 ml :

Fractions	Solvant	Coloration	Cyanidine	Nature de la substance éluee
1 à 10	Ether de pétrole	0	0	—
11 à 30	Chloroforme	0	0	—
31 à 40	id.	jaune	0	matières grasses
41 à 68	Ether éthylique	0	0	—
69 à 98	Acétate d'éthyle	0	0	—
99 à 108	Acétate d'éthyle			
	+ 1 % méthanol	0	0	—
109 à 118	+ 5 % méthanol	0	0	—
119 à 148	+ 20 % méthanol	jaune	+	flavanone

Pour 0.50 g de substance brute, ce premier essai n'a permis de recueillir finalement que 0.15 g de substance purifiée, poudre jaune d'odeur légèrement aromatique. Le point de fusion déterminé au bloc Maquenne est voisin de 250°.

Mais l'élution est laborieuse et la substance étant très fortement adsorbée sur la colonne n'est finalement éluee que par de l'acétate d'éthyle renfermant 20 % d'alcool.

Essai n° 2 : Colonne montée comme précédemment, mais 2 g de substance brute ont été traités.

L'élution se fait aussi dans le même ordre, soit :

— Ether de pétrole : sans résultat.

— Chloroforme R. P. : colonne colorée en brun clair. Aucune élution de flavones.

— Ether éthylique pur : décoloration complète de la colonne.

— Acétate d'éthyle pur : colonne colorée de nouveau en brun clair. Les liqueurs éluees présentent une réaction de la cyanidine faiblement orangée.

— Acétate d'éthyle pur + 1 % de méthanol pur : colonne colorée en jaune mais pas d'élution sensible du produit.

— Acétate d'éthyle + 5 % de méthanol, puis 10 % et 20 % de méthanol : liquides d'élution jaune vif puis incolores.

Ces mélanges permettent d'éluer les produits réunis dans le tableau suivant :

Solvant	Poids de substance purifiée obtenue	Coloration	Cyanidine	Point de fusion
Acétate éthyle				
+ 5 % de méthanol	0,11 g	jaune citron	+	155°
Acétate éthyle				
+ 10 % de méthanol				
— Fraction n° 1	0,09 g	jaune vif	+	160°-162°
— Fraction n° 2	0,18 g	jaune brun	+	140°-142°
Acétate éthyle				
+ 20 % de méthanol	0,42 g	jaune très pâle	+	vers 200°

Cette méthode sépare donc des produits qui présentent tous une réaction de la cyanidine positive mais dont les points de fusion sont variables. En outre un essai à la flamme sur lame de nickel montre l'existence d'un résidu minéral. Les flavones, très fortement adsorbées et difficilement éluées, semblent en outre fixer des sels minéraux.

c) *Colonne de silicate de magnésium technique (Prolabo) :*

Le montage de la colonne est identique ; l'élution s'effectue dans le même ordre. Seul, l'acétate d'éthyle renfermant 20 % de méthanol permet d'extraire la flavone, sans amélioration sur les essais précédents.

d) *Colonne de Kieselguhr (Hyflo-Super-Cel) :*

Un premier essai est effectué avec 0,50 g de substance brute pour 17 g d'adsorbant. L'élution se fait successivement par :

- 120 ml d'éther de pétrole ;
- 230 ml de chloroforme R. P. ;
- 320 ml d'éther éthylique pur ;
- 460 ml d'acétate d'éthyle pur ;
- 200 ml d'acétate d'éthyle renfermant 1 % de méthanol.

Chaque fraction est étudiée comme ci-dessus :

Fractions	Solvant	Coloration	Cyanidine	Nature de la substance éluee
1 à 12	Ether de pétrole	0	0	0,007 g stérols
13 à 35	Chloroforme	jaune pâle	0	0,009 g résines
36 à 67	Ether	0	0	0,002 g graisses
68 à 77	Acétate d'éthyle	0	0	0
78 à 114	Acétate d'éthyle	jaune pâle	+ +	0,176 g flavanone
115 à 134	Acétate d'éthyle + 1 % méthanol	jaune pâle	+ +	0,047 g flavanone

Les précipités recueillis après concentration sous pression réduite des solutions extractives représentent en tout 0,22 g d'une poudre microcristalline jaune pâle, légèrement amère. Le point de fusion : 132°-134° (bleu Maquenne) est donc très voisin de celui de la substance purifiée par microextraction. De plus, le rendement est nettement supérieur à celui obtenu par chromatographie sur Magnésol et la substance est extraite en grande partie par l'acétate d'éthyle pur, non additionné d'alcool.

1 g de produit brut traités selon ce procédé ont donné 1,60 g de produit purifié présentant les mêmes caractéristiques :

- la réaction de la cyanidine donne une teinte rose violacé intense ;
- coloration jaune fluorescent avec l'acétate de magnésium et le chlorure d'aluminium ;
- en outre la réaction citro-borique de WILSON (test habituellement négatif avec les flavanones) est ici positif (jaune fluorescent), prouvant la présence de dérivé chalconique.

L'analyse élémentaire a été effectuée sur ce produit déshydraté sous vide à la température d'ébullition du toluène (110°). Les résultats suivants furent d'ailleurs l'objet d'une communication préliminaire (106) :

Trouvé : C = 50,72 %

H = 6,25 %

O (par différence) = 43 %

Calculé pour $C_{27}H_{32}O_{13} \cdot 4 OH_2$:

C = 50,94 %

H = 6,28 %

O = 42,78 %

III. — Chromatographie de partage sur colonne de cellulose hydratée.

Les essais furent menés, d'une part avec les liqueurs hydro-alcooliques provenant de l'extraction par la méthode de SESHADRI et PURI, d'autre part avec les flavonoïdes bruts obtenus lors des extractions par les solvants successifs.

a) *Fractionnement des liqueurs concentrées :*

Essai n° 1. — Une colonne renfermant 37,50 g de cellulose DURIEUX est imbibée du mélange de 40 ml de solution concentrée de flavonoïdes et de 45 ml d'eau.

L'élution est effectuée avec de l'acétate d'éthyle saturé d'eau. Il se produit rapidement un phénomène de démixion et on obtient finalement une phase aqueuse brune surmontée d'une phase organique jaune citron. La phase organique est la première examinée : après concentration sous pression réduite jusqu'à début de précipitation et repos au réfrigérateur, on recueille 0,52 g d'un beau précipité jaune soufre pour 40 ml de solution initiale (correspondant à 400 g de plante).

Les réactions colorées sont les suivantes :

- cyanidine : faiblement positive (rose pâle) ;
- réaction citro-borique : jaune ;
- chlorure ferrique : jaune.

Le point de fusion se situe vers 146°.

Cependant, par chromatographie sur papier, dans l'acide acétique à 15 % pendant 4 heures, apparaissent, après révélation par la potasse alcoolique à 5 %, deux taches jaunes, dont l'une plus importante.

La phase aqueuse, après concentration et repos ne donne aucun précipité. La solution est alors concentrée à sec pour être soumise à l'épuisement à reflux par les solvants suivants, successivement : éther, acétate d'éthyle, acétate d'éthyle additionné de 10 % d'alcool, de 20 % d'alcool, de 50 % d'alcool.

Dans aucun cas il n'a été possible de séparer de dérivés flavoniques à partir de ces différents extraits.

Essai n° 2. — Une colonne identique est montée et imbibée des 40 ml de liqueur hydro-alcoolique concentrée. Elle est éluée par de l'acétate d'éthyle qui passe immédiatement coloré en jaune vif.

Après concentration de ces solutions d'éluion, on sépare 0.50 g d'un poudre jaune pâle et dont les réactions colorées indiquent que l'on a un dérivé flavanonique à peu près pur. Le point de fusion est voisin de 143°. Cependant, en chromatographie sur papier, deux taches sont encore présentes, celle qui a le plus migré étant la plus intense.

Essai n° 3. — La colonne est montée de la même manière et imbibée par 40 ml de solution mère additionnés de 45 ml d'eau. Le solvant d'éluion est un mélange d'acétate d'éthyle et de 10 % d'alcool éthylique saturé d'eau. De même qu'au cours du premier essai, le phénomène de démixion apparaît et, à partir des liqueurs éluées, aucun produit n'a pu être recueilli.

Les deux substances recueillies au cours des essais nos 1 et 2 sont alors étudiées avec plus de précision par chromatographie sur papier Arches n° 302. La migration effectuée dans l'acide acétique à 15 % révèle l'existence de deux taches, comme il a déjà été dit. Celle qui a le moins migré ($R_f = 0,45$) apparaît jaune à l'œil nu, brune en lumière ultraviolette et jaune vif après l'action de la potasse alcoolique à 5 % ; l'autre tache est invisible à l'œil nu, elle est jaune en lumière ultraviolette et après révélation par la potasse alcoolique ($R_f \neq 0,81$).

Nous faisons alors, sur le papier à chromatographie, non plus des taches, mais un étalement rectiligne avec une solution alcoolique à 1 % de la substance. Après migration et séchage, le papier est découpé en bandes transversales, correspondant aux 2 lignes révélées aux U. V., et chaque bande est élue séparément par de l'alcool méthylique. Sont recueillies séparément :

— la substance qui migre le moins, donnant après évaporation du solvant un dépôt jaune, cristallisé en aiguilles (réaction de la cyanidine nulle, réaction citro-borique jaune intense). Il semble s'agir d'une chalcone pure.

— la seconde substance qui présente une cyanidine particulièrement intense et une réaction citro-borique nulle est donc une flavanone pure.

Ayant en chromatographie sur papier une séparation satisfaisante des deux substances par l'acide acétique à 15 %, nous avons cherché un solvant ou un mélange de solvants organiques qui permettraient d'arriver aux mêmes résultats et d'opérer sur colonne de cellulose. Ont été essayés ainsi :

- acétate d'éthyle saturé d'eau ;
- acétate d'éthyle : 80 — acétone : 20, saturés d'eau ;
- acétate d'éthyle : 60 — acétone : 40, saturés d'eau ;
- acétate d'éthyle : 40 — acétone : 60, saturés d'eau ;
- acétate d'éthyle : 80 — alcool éthylique : 20, saturés d'eau ;
- butanol : 20 — acétone : 80 — eau 5 ;
- butanol : 20 — acétate d'éthyle : 80, saturés d'eau.

Avec la plupart de ces mélanges on obtient des trainées et non des taches bien limitées. Aucun ne fournit une séparation aussi nette des deux flavonoïdes que l'acide acétique à 15 %. L'acétate d'éthyle saturé d'eau, où la flavanone migre davantage que la chalcone, peut être retenu. Avec ces quelques indications, les essais de fractionnement sur colonnes de cellulose ont été repris.

Essai n° 4. — A la partie supérieure d'une colonne de cellulose 0,45 g de mélange flavonique obtenu au cours des essais précédents sont placés et élués successivement par l'acétate d'éthyle saturé d'eau, puis l'acétate d'éthyle additionné de 10 % d'acétone, saturés d'eau.

L'élution par l'acétate d'éthyle saturé d'eau se révèle seule intéressante, l'acétate d'éthyle étant recueilli par fractions de 50 ml. Chaque fraction est concentrée au demi et examinée en chromatographie papier.

Les premières, colorées en jaune, sont surtout riches en chalcone. De la sixième à la neuvième, elles sont pratiquement incolores et ne donnent plus que la seule tache de la flavanone.

Concentrées jusqu'à début de précipitation, elles permettent de recueillir environ 0.08 g de flavanone semi-cristalline de teinte ivoire dont la réaction de la cyanidine est très intense et la réaction citroborique nulle. Le point de fusion est de 139-140°.

b) *Fractionnement des flavonoïdes bruts :*

A la surface de 35 g de cellulose sont placés 1.50 g de substance brute provenant des extractions effectuées au Soxhlet ou par lixiviation. Les éluations sont réalisées successivement par :

- acétate d'éthyle additionné de 20% de chloroforme, saturés d'eau ;
- acétate d'éthyle additionné de 10% de chloroforme, saturés d'eau ;
- acétate d'éthyle saturé d'eau ;
- acétate d'éthyle additionné de 10% d'acétone, saturés d'eau ;
- acétate d'éthyle additionné de 20% d'acétone, saturés d'eau ;
- alcool éthylique à 60%.

Le premier mélange donne un éluat jaune pâle qui renferme seulement des traces de chalcone, le second, au début, un liquide jaune vif, la colonne entière prenant cette teinte. L'éluat est prolongée jusqu'à ce que le liquide soit incolore (au total 1.500 ml ont été utilisés). Après concentration, un précipité semi-cristallin, jaune vif est recueilli (cyanidine pratiquement nulle, réaction de WILSON fortement positive).

Par chromatographie sur papier, on obtient une tache intense de $R_f = 0.45$ qui correspond à la chalcone, accompagnée de traces de flavanone. Le point de fusion se situe vers 139-140°. Si l'on poursuit l'éluat, les liqueurs passent incolores mais présentent une réaction de la cyanidine de plus en plus intense, indiquant la présence de la flavanone. L'éluat est poursuivie alors avec l'acétate d'éthyle saturé d'eau, qui s'est révélé déjà un solvant convenable pour l'extraction de cette substance. Par concentration des solutions d'éluat à peine colorées, on sépare un précipité blanchâtre dont la cyanidine est extrêmement intense et la réaction citroborique de WILSON nulle. Une seule tache apparaît en chromatographie, celle de la flavanone, de R_f 0.81. Le point de fusion se situe vers 132-134°.

Nous avons ainsi séparé, sur colonne de cellulose, en milieu hydraté, chalcone et flavanone, à partir des dérivés flavoniques bruts obtenus par lixiviation ou extraction au Soxhlet. A partir des solutions obte-

nues par la méthode de PURI et SESHADRI, nous n'avons pu recueillir, et seulement après deux fractionnements successifs sur colonne de cellulose, que la seule flavanone.

1,50 g de substance brute ont fourni :

— 0,194 g de dérivé chalconique pur,

— 0,113 g de dérivé flavanonique pur.

Grâce à ce procédé de fractionnement il a été possible d'effectuer l'étude chimique de chacune de ces substances.

Une étude physico-chimique préliminaire effectuée sur la flavanone purifiée sur colonne de Lieselguhr fut publiée avec R. PARIS en 1955 (106). Ultérieurement, nous venons de le voir, par chromatographie de partage sur colonne de cellulose hydratée, la même substance a été obtenue dans un plus grand état de pureté et la séparation de la chalcone qui l'accompagne dans les produits bruts a été réalisée. Les propriétés physiques et chimiques des deux substances pures ont donc été étudiées.

Etude physico-chimique du liquiritoside (Flavanone)

I. — Propriétés physiques

Aspect : poudre microcristalline blanc ivoire, inodore, légèrement amère, non hygroscopique.

Solubilités : insoluble dans l'éther de pétrole, le benzène, le chloroforme ; peu soluble dans l'éther ; assez soluble dans l'acétate d'éthyle ; soluble dans l'éthanol et le méthanol.

Point de fusion instantané (bloc Maquenne) : la substance fut préalablement déshydratée sous vide successivement, pendant 3 heures à la température d'ébullition du benzène (80°), puis du toluène (110°). Elle perd au total 6 % de son poids. Le point de fusion instantané trouvé est alors : 138°-140°.

Chromatographie sur papier : La chromatographie ascendante sur papier Arches n° 302 a fourni un seul spot. Ont été utilisés comme révélateurs :

— la lumière ultra-violette ;

— la potasse alcoolique à 5 % ;

— le chlorure d'aluminium à 2 % ;

qui donnent tous un spot jaune, avec fluorescence bleue en lumière ultra-violette dans le dernier cas.

Les Rf suivants ont été déterminés :

— 0,56 avec le butanol acétique (temps de montée : 16 heures ; température : 16°) ;

— 0,81 avec l'acide acétique aqueux à 15 % (temps de montée : 8 heures ; température : 14°).

Spectre d'absorption ultra-violet :

Il a été déterminé à l'aide du spectrophotomètre Unicam S. P. 500 sur une solution à 1/50.000 dans l'alcool à 96°.

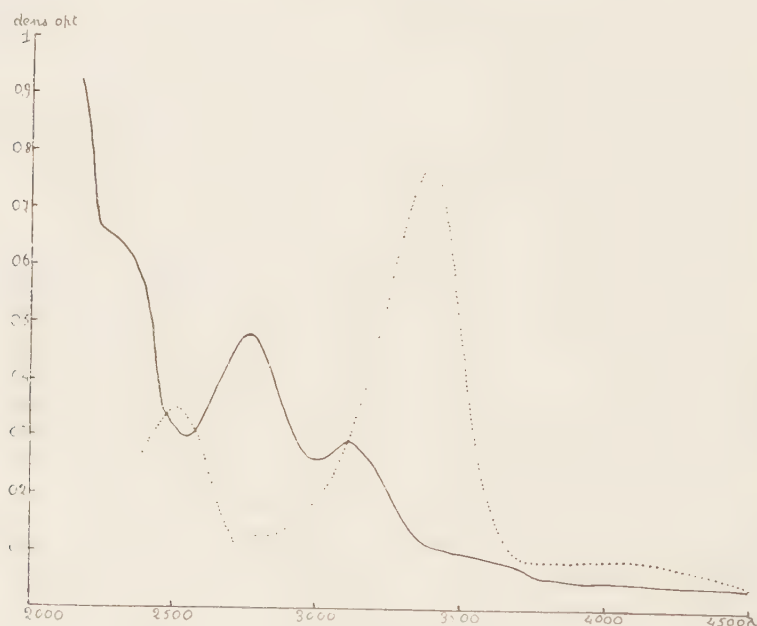


FIGURE 4. — Spectre d'absorption dans l'ultra-violet du liquiritoside en solution au 1/50.000 dans l'éthanol à 96° :
 — en milieu neutre. en milieu alcalin.

Le spectre, en milieu alcoolique neutre, présente trois minimums à 2.550, 3.000 et 3.400 Å et deux maximums à 2.750 et 3.100 Å.

En milieu alcalin, après addition de III gouttes de lessive de soude à 2 ml de solution alcoolique, le spectre présente deux minimums à 2.750 et 3.700 Å et trois maximums à 2.500, 3.400 et un plateau à 4.100 Å, comme en témoigne la figure n° 4.



FIGURE 5. — Spectre infrarouge du liquiritoside dans le nujol.

Spectre d'absorption infra-rouge :

Il a été déterminé avec l'appareil de BAIRD sur la substance en suspension dans le nujol. Aux environs de $2,7 \mu$ on a une bande d'absorption marquée, indiquant la présence d'hydroxyles : vers $6,3 \mu$ la courbe présente une inflexion : vers $9,3 \mu$ une nouvelle inflexion. Il existe encore une bande d'absorption à $13,8 \mu$ comme c'est le cas pour de nombreux dérivés flavoniques (Figure n° 5)*.

II. — Analyse élémentaire

Effectuée sur le produit déshydraté, elle a fourni les résultats suivants** :

Trouvé : C = 53,91 et 53,74 %

H = 5,98 et 6,05 %

Calculé pour $C_{27}H_{32}O_{13}, 2H_2O$; C = 54,05 %

(P. M. 600) H = 6,05 %

III. — Propriétés chimiques

1) Réactions colorées :

Cette flavanone présente les réactions colorées communes à ce groupe de substances :

- coloration jaune intense en milieu alcalin ;
- coloration rose violacé intense par addition de copeaux de magnésium en milieu chlorhydrique (réaction de la cyanidine) ;
- coloration rose pâle en remplaçant les copeaux de magnésium par de la poudre de zinc ;
- réduction lente du nitrate d'argent ammoniacal et du réactif phosphomolybdique de FOLIN ;
- coloration verdâtre ou brunâtre avec le chlorure ferrique en solution alcoolique, alors que les auteurs hindous ne reconnaissent aucune coloration ;
- coloration jaune-orange avec le pentachlorure d'antimoine en solution à 2 % dans le tétrachlorure de carbone, selon MARINI (92).

Enfin, on n'obtient aucune coloration pour la flavanone pure par la réaction citro-borique de WILSON. Cette dernière réaction, extrêmement sensible, permet en effet de mettre en évidence des traces de chalcone accompagnant le liquiritoside.

* Cette détermination a été effectuée sous la direction du Professeur GUY auquel nous adressons nos remerciements.

** Cette détermination a été effectuée sous la direction du Professeur DAMIENS (service du Professeur DELABY) auquel nous adressons nos remerciements.

2) *Hydrolyse acide* :

L'hydrolyse acide fut effectuée afin d'étudier la génine et les sucres libérés et de comparer les résultats obtenus à ceux de SHINODA et UEEDA (128).

— *Essai n° 1* : réalisé en milieu aqueux, avec une solution d'hétéroside à 1 % dans l'acide sulfurique à 2 % en volume. La solution est portée au bain-marie bouillant pendant 4 heures, dans un ballon muni d'un réfrigérant à reflux.

La dissolution de l'hétéroside n'est pas complète à froid, mais presque totale à chaud. Au bout d'une heure la solution se trouble et, en fin d'hydrolyse, on peut recueillir sur un creuset en verre fritté un précipité résineux, noirâtre, qui ne tarde pas, d'ailleurs, à colmater le filtre.

Le liquide aqueux d'hydrolyse est épuisé à plusieurs reprises par de l'éther qui se colore en jaune. Les solutions éthérées sont déshydratées sur sulfate de sodium anhydre, puis évaporées dans un cristalliseur. On obtient un petit résidu, avec début de cristallisation en quelques points, mais la plus grande partie de la génine est constituée par le précipité résineux. Elle est altérée et ne permet aucune étude.

— *Essai n° 2* : réalisé selon les conditions indiquées par SHINODA(128).

Une solution d'hétéroside à 2 % dans de l'alcool à 50° renfermant 10 % d'acide sulfurique en poids est portée au bain-marie bouillant pendant 30 minutes.

La dissolution de l'hétéroside est à peu près complète et le liquide prend une coloration brune. Quand l'hydrolyse est terminée, on concentre à demi-volume afin d'éliminer l'alcool et on remplace par égal volume d'eau. Or, au cours de la concentration, est apparue une sorte de résine noirâtre inutilisable.

La solution aqueuse, après refroidissement et séjour au frigidaire, a donné un très faible précipité qui, examiné au microscope, apparaît cristallisé en oursins. Mais il est trop peu abondant pour être étudié.

En conclusion de ces deux essais il apparaît qu'en milieu aqueux il y a altération de la génine, de même qu'en présence d'une concentration trop élevée en acide sulfurique : pour obtenir une hydrolyse complète, il faut opérer en milieu hydro-alcoolique, en présence d'un acide minéral moins concentré et il est nécessaire de chauffer pendant plusieurs heures.

— *Essai n° 3* : une solution d'hétéroside à 1 % dans de l'alcool à 50° renfermant 5 % d'acide sulfurique en poids est portée au bain-

marie bouillant pendant 4 heures. La solution limpide, jaune, est alors concentrée au demi sous pression réduite afin d'éliminer l'alcool. Par refroidissement elle se trouble et après repos au frigidaire le précipité de génine est recueilli sur creuset de GOOCH taré, lavé à l'eau distillée, séché sous vide phosphorique et pesé :

0,23 g. d'hétéroside a donné 0,11 g. de génine (Rendement : 49 %).

La génine est purifiée par dissolution dans l'éther. Ce solvant, évaporé à l'air libre, laisse un résidu qui est repris par le minimum d'alcool à 96° bouillant. Par addition d'eau, la génine précipite et cristallise en oursins.

La solution aqueuse d'hydrolyse est neutralisée par le carbonate de baryum et conservée pour l'étude des sucres.

a) ETUDE DE LA GÉNINE

Aspect : elle cristallise en oursins jaune orangé.

Solubilités : insoluble dans l'eau, l'alcool faible ; soluble dans l'éther, l'alcool fort.

Point de fusion : (bloc Maquenne)

— 204° avant déshydratation dans l'appareil de BOUILLOT.

— 206° après déshydratation à 130° (ébullition du xylène pendant 3 heures), la substance accusant une perte de poids de 6 %.

Réactions colorées : elles sont voisines de celles du glucoside. On peut noter de légères différences :

— la réaction de la cyanidine, instantanée, est bleu violacé.

— avec le perchlorure de fer, la coloration est brun verdâtre foncé.

Chromatographie sur papier : En chromatographie ascendante sur papier Arches n° 302 et selon la phase entraînante utilisée, les Rf suivants ont été déterminés :

— 0,94 avec le butanol acétique (temps de diffusion : 5 heures ; température : 22°) ;

— 0,14 avec l'acide acétique à 15 % (temps de diffusion : 3 heures ; température : 22°).

Les révélateurs utilisés sont les mêmes que pour le glucoside.

Spectre d'absorption ultra-violet : il a été déterminé par examen d'une solution à 1/50.000 dans de l'alcool à 96° pur avec le même appareil que précédemment.

Le spectre en milieu neutre présente 4 maximums à 2.300, 2.750, 3.100 et 3.700 Å et trois minimums à 2.500, 2.950 et 3.400 Å.

En milieu alcalin, il présente 3 maximums à 2.500, 3.400 et 4.400 Å et deux minimums à 2.800 et 3.650 Å.

Analyse élémentaire :

Elle a été effectuée sur le produit déshydraté et a fourni les résultats suivants :

Trouvé : C = 69,62 %
H = 5,23 %
O (par différence) = 25,15 %

Calculé pour $C_{15}H_{12}O_4$: C = 70,3 %
H = 5,07 %
O = 24,63 %

b) ETUDE DES SUCRES

Dans les liqueurs d'hydrolyse, après séparation de la génine, il a été procédé au dosage et à la caractérisation des sucres.

Les solutions acides d'hydrolyse sont neutralisées par le carbonate de baryum. Après filtration, le pouvoir réducteur déterminé sur une portion aliquote par la méthode de G. BERTRAND et exprimé en glucose est de 27 %.

L'identification des sucres a été réalisée :

— d'une part par la formation des osazones par action de l'acétate de phénylhydrazine : glucosazone en branches de genêt, insoluble dans l'acétone, et rhamnosazone en oursins, soluble dans l'acétone.

— d'autre part, grâce à la chromatographie sur papier. Par la méthode ascendante, sur papier Arches n° 302, le filtrat d'hydrolyse neutralisé et concentré de telle sorte qu'il renferme environ 2 % de sucres réducteurs exprimés en glucose a été comparé à des solutions à 2 % de sucres purs.

Les révélateurs utilisés furent :

— la benzidine : 0,50 g pour 20 ml d'acide acétique et 80 ml d'éthanol ;

— le naphtorésorcinol : 0,10 g pour 20 ml d'acide chlorhydrique environ 2 N et 80 ml d'éthanol.

Ont été déterminés :

— Avec le butanol acétique, comme solvant (temps de montée 15 heures 50 ; température : 22°) deux spots de Rf 0,27 et 0,46 pour la liqueur d'hydrolyse ; un spot de Rf 0,25 pour le glucose et un spot de Rf 0,46 pour le rhamnose.

— Avec la phase organique du mélange : alcool iso-amylique : 7, pyridine = 7, eau = 2 (temps de montée : 14 heures 15 ; température : 24°) deux spots de Rf 0,33 et 0,54 pour la liqueur d'hydrolyse ; un spot de Rf 0,30 pour le glucose, un spot de Rf 0,51 pour le rhamnose.

Les liqueurs d'hydrolyse du liquiritoside renferment donc bien deux oses : glucose et rhamnose, dont un seul fut signalé par SHINODA (128) et par PURI (117), le glucose.

Conclusion :

La flavanone que nous avons isolée fournit par hydrolyse du glucose et du rhamnose, et non pas simplement du glucose comme l'avaient indiqué SHINODA et UEEDA (128), puis PURI et SESHADRI (117). La présence des deux sucres est en accord avec la teneur en génine et la composition centésimale de l'hétéroside pour lequel, avec R. PARIS, nous avons proposé précédemment la formule $C_{27}H_{32}O_{13}, 4 H_2O$.

Or, nous proposons maintenant pour le liquiritoside la formule $C_{27}H_{32}O_{13}, 2H_2O$ (P. M. 600), qui correspond à une génine en $C_{15}H_{12}O_4$ (P. M. 256) unie à une molécule de rhamnose (P. M. 164) et une molécule de glucose (P. M. 180), avec élimination de deux molécules d'eau, l'hétéroside cristallisant lui-même avec deux molécules d'eau. Les résultats de l'analyse élémentaire (voir p. 64) sont en accord avec cette formule.

A côté de la flavanone a été séparée une chalcone isomère dont l'étude physico-chimique a pu être effectuée.

D. **Etude physico-chimique de l'isoliquiritoside (Chalcone)**

I. — Propriétés physiques

Aspect : poudre microcristalline jaune vif, inodore, légèrement amère, non hygroscopique.

Solubilités : insoluble dans l'éther de pétrole, le benzène ; légèrement soluble dans l'acétate d'éthyle, l'acétone, le chloroforme ; très soluble dans l'eau, l'alcool éthylique, l'alcool méthylique.

Point de fusion : (bloc Maquenne). La substance a été déshydratée au préalable pendant 3 heures, d'abord à la température d'ébullition du benzène (80°), puis à celle du toluène (110°). Elle perd au total 6,6 % de son poids dans ces conditions. Le point de fusion instantané est de 172°.

Chromatographie sur papier : La chromatographie ascendante réalisée dans les mêmes conditions que pour l'étude de la flavanone a donné, en lumière ultra-violet, un spot brun qui devient jaune intense après révélation par la potasse alcoolique à 5 % ou le chlorure d'aluminium à 2 %.

Les Rf suivants ont été déterminés : 0,52 (butanol acétique) ; 0,45 (acide acétique à 15 %).

Spectre d'absorption ultra-violet : déterminé par examen d'une solution à 1/50.000 dans de l'alcool à 96° pur, il présente :

— en milieu neutre, 3 maximums à 2.720, 3.120 et 3.650 Å et 3 minimums à 2.500, 3.000 et 3.400 Å ;

— en milieu alcalin, trois maximums à 2.500, 3.400 et 4.100 Å et deux minimums à 2.850 et 3.650 Å (Figure n° 6).

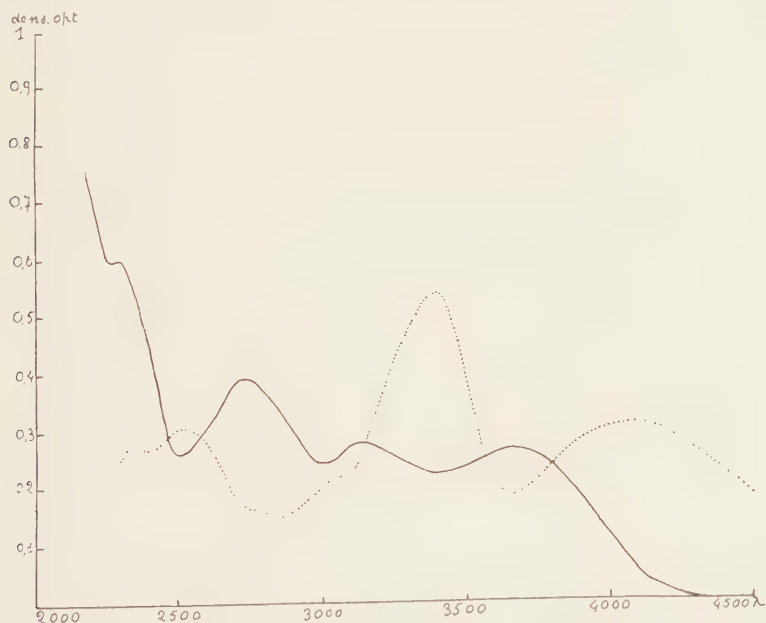


FIGURE 6. — Spectre d'absorption dans l'ultra-violet de l'iso-liquiritoside en solution au 1/50.000 dans l'éthanol à 96° :

— - en milieu neutre.

..... en milieu alcalin.

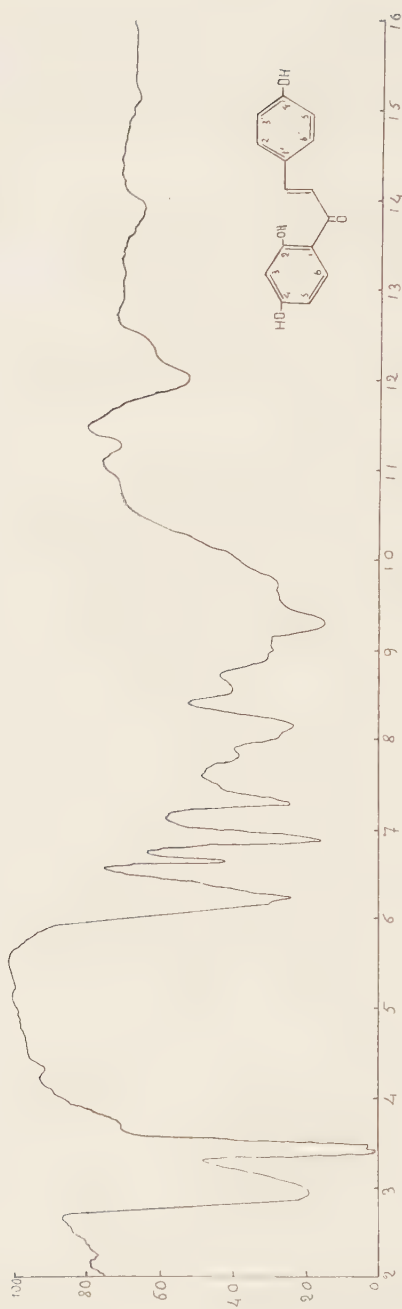


FIGURE 7. — Spectre infrarouge de l'iso-liquiritoside dans le nujol.

Spectre d'absorption infra-rouge : déterminé comme précédemment avec l'appareil de BAIRD sur la chalcone en suspension dans le nujol, on a, vers $2,7 \mu$ une bande d'absorption plus marquée que celle de la flavanone, indiquant un plus grand nombre d'hydroxyles : vers $6,2 \mu$ et $6,6 \mu$ deux inflexions, la seconde marquant la présence d'une double liaison supplémentaire : vers $8,2 \mu$ l'inflexion, également plus accentuée que celle de la flavanone, indique que le carbonyle ne fait plus partie du noyau pyrone. Enfin on a deux autres bandes d'absorption vers $9,3$ et $13,8 \mu$ (Figure n° 7).

II. — Analyse élémentaire

Effectuée sur la substance déshydratée, elle a donné les résultats suivants :

Trouvé : C = 53,89 et 53,97 %
H = 6,21 et 6,09 %

Calculé pour : $C_{27}H_{32}O_{13} \cdot 2H_2O$: C = 54,05 %
H = 6,05 %

L'hétéroside chalconique ou iso-liquiritoside est donc bien isomère de l'hétéroside flavanonique ou liquiritoside.

III. — Propriétés chimiques

1) Réactions colorées :

Il présente les réactions communes à ce groupe de substances :

- coloration jaune intense, immédiate, en milieu alcalin ;
- réaction de la cyanidine nulle ou extrêmement faible ;
- réaction citro-borique de WILSON réalisée en milieu acétonique anhydre : jaune vif, fluorescent ;
- pas de coloration en présence de chlorure ferrique, contrairement à ce qu'ont publié PURI et SESHADRI (117) ;
- coloration rouge vif en présence d'une solution de pentachlorure d'antimoine (réaction de MARINI).

2) Hydrolyse acide :

Elle fut réalisée sur une solution de chalcone à 1 % dans de l'alcool à 50° renfermant 5 % d'acide sulfurique en poids, portée au bain-marie bouillant pendant 4 heures. La solution limpide, jaune foncé, est concentrée au demi sous pression réduite. Par refroidissement et repos pendant 24 heures à la température ordinaire, un trouble apparaît. Après repos

48 heures à la glacière, un précipité cristallisé s'est formé, le liquide surnageant étant limpide et jaune pâle.

Recueilli sur creuset de Gooch taré, ce précipité est rougeâtre : 0,50 g d'hétéroside ont donné 0,23 g de génine, soit un rendement de 47 %.

La solution aqueuse d'hydrolyse est neutralisée par le carbonate de baryum et conservée pour l'étude des sucres.

a) ÉTUDE DE LA GÉNINE

Aspect : identique à celui de la génine flavanonique.

Solubilités : identiques.

Point de fusion : identique.

Les réactions colorées : sont les mêmes, la cyanidine n'apparaissant positive qu'au bout de quelques secondes.

En chromatographie sur papier : par les mêmes solvants et les mêmes révélateurs, les R_f suivants ont été déterminés : 0,94 (butanol acétique), 0,14 (acide acétique à 15 %).

Spectre d'absorption ultra-violet : déterminé sur une solution à 1/50.000 dans l'alcool à 96° pur, il présente :

— en milieu neutre, quatre maximums à 2.330, 2.750, 3.130 et 3.750 Å et trois minimums à 2.500, 3.000 et 3.400 Å ;

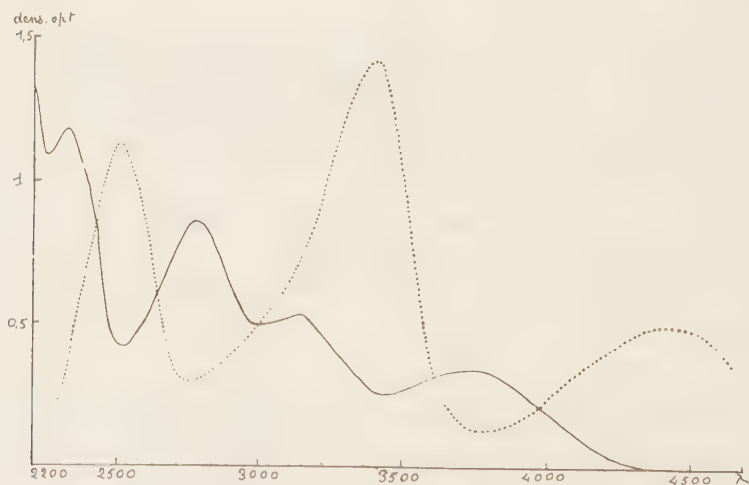


FIGURE 8. — Spectre d'absorption dans l'ultra-violet de l'iso-liquiritigénine en solution au 1/50.000 dans l'éthanol à 96° :
 — en milieu neutre. en milieu alcalin.

— en milieu alcalin, trois maximums à 2.500, 3.400 et 4.400 Å et deux minimums à 2.750 et 3.750 Å (Figure 1.^o 8).

Celui-ci est pratiquement identique au spectre ultra-violet de la génine flavanonique. Il apparaît donc que la génine obtenue par hydrolyse de l'iso-liquiritose est identique à celle précédemment étudiée. Il y a eu isomérisation au cours de l'hydrolyse acide et l'analyse élémentaire n'a, pour cette raison, pas été effectuée.

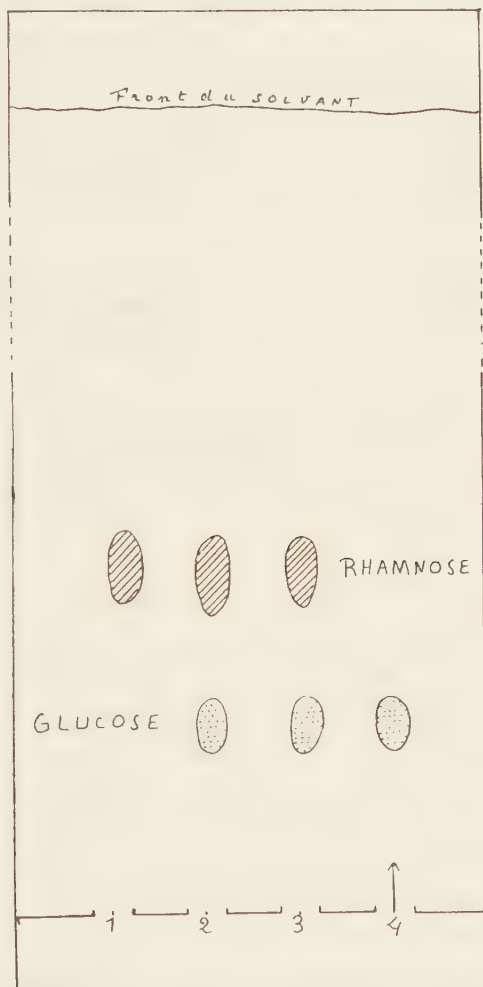


FIGURE 9. — Chromatographie ascendante des liqueurs d'hydrolyse du liquiritoside et de l'iso-liquiritose (solvant : butanol acétique) :

- | | |
|---------------------|---------------------|
| 1. Rhamnose témoin. | 3. Iso-liquiritose. |
| 2. Liquiritoside. | 4. Glucose témoin. |

b) ETUDE DES SUCRES :

Le pouvoir réducteur des solutions d'hydrolyse neutralisées par le carbonate de baryum a été déterminé par la méthode de G. BERTRAND.

Résultats : 10 ml de solution d'hétéroside à 1 % renferment 0,031 g de sucres réducteurs exprimés en glucose, soit une proportion de 31 %

L'hydrolyse avait donné d'autre part, nous le rappelons, 47 % de génine.

Il a été procédé à l'identification de la partie osidique par chromatographie sur papier (voir p. 67) et les deux spots de Rf 0,18 et 0,33 (butanol acétique) et 0,30 et 0,50 (acide acétique à 15 %) ont été identifiés avec certitude au glucose (Rf 0,18 et 0,30) et au rhamnose (Rf 0,35 et 0,51) (Figure 9).

E. — Etude en chromatographie sur papier des préparations de Réglisse

Au cours des travaux préliminaires, quelques essais avaient été effectués. Mais l'étude chromatographique a été reprise après l'isolement des dérivés flavoniques témoins purs qui ont ainsi permis l'identification de certains spots fournis par les teintures ou les sucs de Réglisse.

I. — Substances témoins

Quatre substances ont été essayées : le liquiritoside (flavanone) et sa génine, l'iso-liquiritoside (chalcone) et sa génine.

Les mêmes solvants que précédemment ont été utilisés (mélange de Partridge, acide acétique à 15 %), ainsi que l'acide acétique à 60 %. Mais ce dernier solvant ne fut pas retenu parce qu'il semble altérer les flavonoïdes de la Réglisse, les hétérosides fournissant alors deux taches et les génines trois taches.

Ont été utilisés comme révélateurs :

- lumière ultra-violette ;
- potasse alcoolique à 5 % ;
- chlorure d'aluminium à 5 % dans l'alcool à 50°, suivi d'un examen en lumière ultra-violette ;
- acétate de magnésium à 5 % dans l'alcool à 95°.

Le tableau suivant groupe les colorations obtenues :

Révélateurs	Flavanone	Chalcone	Génine F.	Génine Ch.
U. V. K O H Cl ₃ Al + U. V. Acétate Mg	Jaune pâle jaune clair Fluorescence bleue jaune clair	brun jaune intense jaune jaune	jaune jaune jaune jaune	jaune jaune jaune jaune

En chromatographie ascendante, sur papier Arches n° 302 avec le mélange de Partridge (temps de montée : 16 heures à 20°) et l'acide acétique à 15 % (temps de montée : 6 heures 30 à 20°).

Les Rf suivants furent obtenus :

	Liquiritoside Flavanone	Liquiritoside Chalcone	Génine Flavanonique	Génine Chalconique
Mélange de Partridge..	0,52-0,54	0,52-0,54	0,90-0,94	0,90-0,94
CH ₃ COOH 15 %.....	0,75-0,77	0,45	0,10-0,12	0,10-0,12

Les génines ne sont donc pas différenciées en chromatographie sur papier, ce qui est en accord avec ce qui a été dit plus haut : formation de la même génine par isomérisation au cours de l'hydrolyse. Par contre, les hétérosides ont des Rf nettement distincts dans l'acide acétique à 15 % ; en outre le chlorure d'aluminium permet de les différencier car le spot de la flavanone, jaune comme celui de la chalcone en lumière ordinaire, présente une belle fluorescence bleue sous lumière ultra-violette.

II. — Chromatographie de teinture de racines et de sucs de Réglisse

Toutes les teintures ont été préparées, par macération, au 1/10 dans l'alcool à 60°, pendant 24 heures à l'étuve à 37°. Les colatures sont filtrées et le volume réajusté avec de l'alcool à 60°. Les taches, sur les chromatogrammes, correspondent à 5 mm³ de chaque teinture.

Un seul solvant, le mélange de Partridge, fut finalement conservé pour le développement des chromatogrammes, car avec l'acide acétique les spots sont dédoublés et plus ou moins déformés.

Les mêmes révélateurs que précédemment furent utilisés. Les résultats sont groupés dans le tableau ci-dessous : sept taches, au maximum,

sont apparues, soit visibles directement à l'examen en lumière ultraviolette, soit seulement après révélation. Ce tableau correspond à la teinture de racine d'Iran dont le chromatogramme est le plus complexe, avec sept taches :

Révélateurs	U. V.	KOH	KOH + U.V.	Cl ₃ Al + U.V.	Acétate Mg+U V.	Interprétation
Rf						
0,20	petite tache ronde bleue	0	0	petite tache bleue	0	non identifiée
0,35	tache allongée jaune	jaune très pâle	0	jaune très pâle	jaune	non identifiée
0,40	tache arrondie bleu fluorescent	0	bleu-vert fluo- rescent	bleu fluorescent	vert	hétéroside coumari- nique ?
0,50- 0,52	tache ovale jaune foncé	jaune vif	jaune	jaune mêlé de bleu fluo- rescent	jaune	hétérosides flavoni- ques
0,70	0	0	bleu	0	0	non identifiée
0,85	tache arrondie bleu clair	0	bleu-vert clair fluorescent	bleu	bleu vert	génine coumarini- que ?
0,95	tache arrondie	jaune	jaune	jaune pâle	0	génine des dérivés flavoniques

Le second tableau montre la répartition des taches dans les divers échantillons de racines et de suc examiné ; en outre, une teinture au 1/10 de glycyrrhizine ammoniacale du commerce a été examinée comparativement.

Rf	0,20	0,35	0,40	0,50	0,70	0,85	0,95
Racine d'Espagne		+	+	+		+	+
— Grèce.....		+	+	+		+	+
— Iran	+	+	+	+	+	+	+
— Italie.....		+	+	+		+	
— France (Noir- moutier)	+	traces		+		+	
— Russie.....	+	+		+		+	+
— Syrie	+	+	+	+		+	+
— Turquie		+	+	+		+	+
— Yougoslavie ...	+	+		+		+	
Suc d'Espagne		trainée	+	+		+	
« Italie		trainée	+	+			
« Turquie	trainée	+	+	+		+	
Glycyrrhizine ammonia- cale.....		+	+	+		+	

Les taches de Rf 0,20 et 0,35 n'ont pas été identifiées ; il en est de même pour la tache Rf 0,70 particulière à la racine d'Iran. Les taches

de Rf 0,40 et 0,85 qui, en lumière ordinaire ne sont pas révélées par la potasse alcoolique, deviennent d'un très beau bleu-vert fluorescent dès qu'on les examine en lumière ultra-violette ; elles sont probablement dues à un hétéroside coumarinique et à sa génine. On voit qu'elles accompagnent presque toujours les dérivés flavoniques dans les racines, de même que dans les sucs de Réglisse.

Enfin la tache de Rf 0,50-0,52, d'une constance parfaite dans tous les échantillons examinés, correspond au mélange des flavonoïdes puisque le mélange de Partridge ne dissocie pas les spots de la flavanone et de la chalcone. La tache de Rf 0,95 correspond à la génine de ces dérivés. A noter qu'on retrouve les spots de flavones dans la glycyrrhizine commerciale et qu'un témoin de glycyrrhizine pure n'est pas visible dans les conditions précédentes ; dans celles indiquées par GOOTJES et NAUTA (56), la révélation par la Rhodamine B ne s'est pas montrée spécifique. D'autre part, le glucose peut être mis en évidence dans les différentes teintures en traitant par la benzidine ou le nitrate d'argent ammoniacal (Rf 0,18).

F. — Dosage des flavonoïdes

I. — Dosage du liquiritoside

Parmi les différentes réactions colorées fournies par la flavanone de la racine de réglisse, la plus intense, la plus stable et la plus spécifique est celle de la cyanidine que nous avons appliquée au dosage colorimétrique. Les travaux de R. PARIS et J. CORNILLEAU (105) nous ont guidé : pour l'étude des conditions optimums de la réaction et son application au dosage dans les préparations à base de Réglisse.

A. — DOSAGE DE LA SUBSTANCE PURE

Les premiers essais effectués ont montré qu'il n'était pas possible d'appliquer sans modification la méthode standard proposée par M^{lle} J. CORNILLEAU, et qu'il était nécessaire de rechercher les conditions donnant la coloration la plus intense.

Toutes les mesures ont été effectuées avec le photolorimètre unicellulaire « Electrosynthèse ».

L'étalon utilisé est le liquiritoside pur défini au chapitre précédent, en solution à 1 % dans de l'alcool à 60°. Les lectures sont effectuées au bout de 10 minutes environ, après refroidissement du tube où a eu lieu la réaction.

Le premier essai fut pratiqué selon les proportions adoptées par M^{lle} J. CORNILLEAU, soit :

— 1 ml de solution de dérivé flavonique à 1 %, complété à 5 ml avec de l'alcool à 60° ;

— 1 ml d'acide chlorhydrique à 32° BAUMÉ (32,5 % ClH, d = 1,19) ;

— 0,075 g de tournure de magnésium ajouté immédiatement après l'acide.

La coloration observée dans ces conditions est rose jaunâtre, donc incomplète. Des essais systématiques ont alors été effectués en faisant varier successivement les quantités d'acide chlorhydrique et de magnésium, ainsi que la concentration en liquiritoside. Les colorations obtenues étaient d'abord regardées à l'œil nu, leur intensité étant ensuite mesurée au photocolorimètre. Nous avons ainsi remarqué qu'une concentration en acide chlorhydrique inférieure à 50 % et une quantité de magnésium inférieure à 0,10 g ne permettaient pas le développement complet de la coloration ; que celle-ci devenait beaucoup trop intense pour des quantités de substances supérieures à 2,5 mg.

1) Détermination de l'absorption en fonction de la longueur d'onde :

Cette détermination doit être faite avec des solutions de concentration telle que l'absorption soit lisible pour tous les filtres du photocolorimètre utilisé, c'est-à-dire que son maximum corresponde à une densité optique d'environ 1,5 et son minimum d'environ 0,08.

La réaction de coloration a été réalisée avec les deux solutions suivantes :

	A	B
Solution alcoolique à 1 % de liquiritoside	0,05 ml	0,10 ml
Alcool éthylique à 60°	2,45 ml	2,40 ml
Acide chlorhydrique	2,5 ml	2,5 ml
Magnésium en tournure	0,15 g	0,15 g

Pour chaque longueur d'onde, un tube témoin rempli de réactif (soit 2,5 ml d'alcool à 60°, 2,5 ml d'acide chlorhydrique et 0,15 g de magnésium) sert à ajuster l'aiguille sur le 100 de la graduation du micro-ampèremètre (qui correspond à une densité optique nulle).

Les deux solutions montrent un premier maximum d'absorption à 460 m μ et un second beaucoup plus accentué à 550 m μ .

Le liquiritoside doit donc être étudié sous filtre jaune vert (corres-

pendant à la longueur d'onde 550 m μ), filtre de couleur complémentaire de celle de la solution colorée.

2) *Détermination de l'intensité de coloration en fonction des proportions d'acide chlorhydrique et de magnésium :*

L'intensité de coloration a été mesurée pour une concentration fixe de 1 mg de substance, en augmentant les proportions d'acide chlorhydrique de 10 en 10 % et pour trois quantités de magnésium : 0,075 g, 0,10 g et 0,15 g.

Magnésium	Concentrations en acide chlorhydrique							
	20 %	30 %	40 %	50 %	60 %	70 %	80 %	90 %
	Densités optiques							
0,075 g	0,09	0,21	0,41	0,55	0,73	0,79	0,90	
0,10 g	0,10	0,32	0,48	0,60	0,70	0,79	0,88	0,93
0,15 g	0,02	0,27	0,51	0,60	0,66	0,94		

On constate que l'intensité de la coloration augmente avec la concentration en acide chlorhydrique, mais que cette augmentation ne croît régulièrement qu'avec 0.10 g de tournure de magnésium. Avec moins de 15 % d'acide chlorhydrique la coloration est très faible.

Nous utiliserons donc, pour nos déterminations une concentration de 50 % en acide chlorhydrique, l'addition de 0,10 g de magnésium en copeaux suivant immédiatement celle de l'acide. La réaction étant fortement exothermique, les tubes sont plongés dans l'eau froide avant d'effectuer la lecture au photolorimètre.

3) *Facteur temps :*

La réaction met peu de temps à atteindre son maximum. Des lectures faites de cinq en cinq minutes montrent que la coloration est stable pendant 20 minutes puis décroît très légèrement pendant les 35 minutes suivantes ; elle s'altère ensuite et diminue très vite au bout d'une heure et demie.

4) *Détermination de l'absorption en fonction de la concentration :*

Des dilutions de la solution étalon étudiée ont été examinées, le témoin sur lequel l'aiguille du microampèremètre est ajusté à 100 étant toujours constitué par le réactif seul.

Le dosage est pratiqué sur 0,05 ml à 0,25 ml de solution à 1 % complétés à 2,5 ml à l'aide d'alcool à 60° et additionnés de 2,5 ml d'acide chlorhydrique à 32° BAUMÉ et de 0,10 g de magnésium.

La courbe A de la figure n° 10 est alors tracée en portant en abscisse les quantités de substance en mg et en ordonnée les densités optiques.

On constate que la loi de BEER-LAMBERT n'est pas vérifiée pour les concentrations inférieures à 0,5 mg de flavanone. Toutefois avec 0,1 mg on observe encore une faible coloration amenant une déviation sensible de l'aiguille du microampèremètre. Pour avoir une bonne mesure, il faudra s'assurer d'une concentration en flavanone comprise entre 0,5 mg et 2,5 mg, limites entre lesquelles la loi de BEER-LAMBERT est vérifiée.

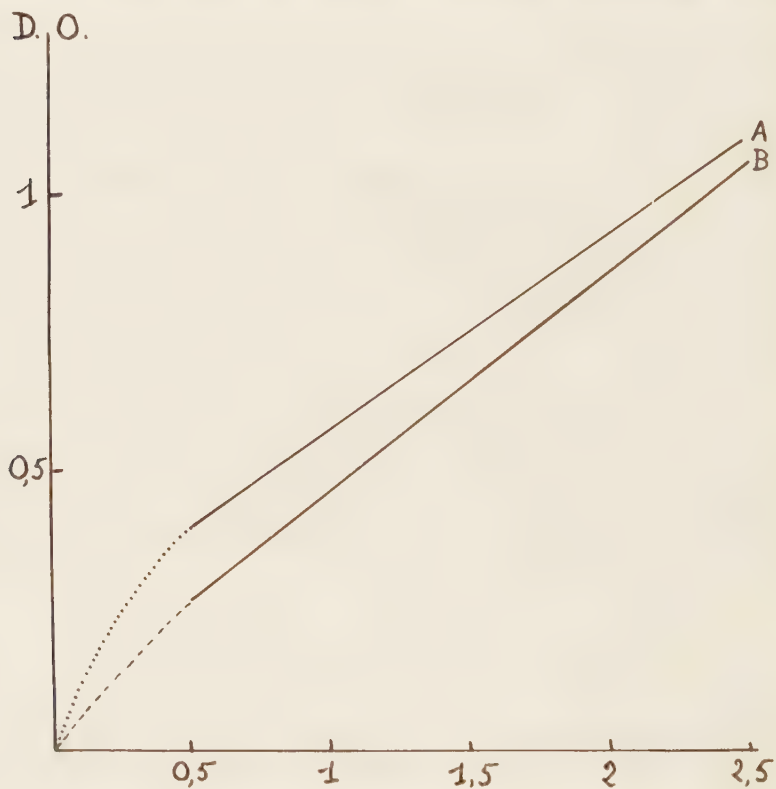


FIGURE 10. — Dosage colorimétrique du liquiritoside par la réaction de la cyanidine :

- A. Courbe directe. B. Après passage sur gel d'alumine.
en abscisse : concentration en liquiritoside en mg ;
en ordonnée : densité optique.

B. — APPLICATION AU DOSAGE DANS LES PRÉPARATIONS DE RÉGLISSE

La réaction de la cyanidine d'un infusé de poudre ou d'une teinture d'extrait total de Réglisse est positive, mais la belle coloration rose

violacé obtenue avec la flavanone pure se trouve plus ou moins altérée et peut varier du rouge vif au jaune orangé. Plusieurs essais directs après macération de la poudre ou dilution de l'extrait dans l'alcool à 80° ou à 60° ont donné des colorations variables et des solutions plus ou moins troubles, impropres à un dosage photolorimétrique.

Nous avons alors décidé d'appliquer le procédé décrit par PORTER, DICKEL et COUCH (116) et adapté par R. PARIS et M^{lle} CORNILLEAU. Sachant que les flavones, substances polyhydroxylées, sont capables de former des complexes analogues aux laques avec différents sels métalliques, ces auteurs réalisent un complexe avec le gel d'alumine. Ce dernier est formé au sein même de la solution de substance à adsorber par addition d'une solution de chlorure d'aluminium, puis d'ammoniaque. On redissout le gel en ajoutant de l'acide acétique. PORTER et ses collaborateurs appliquent cette méthode au dosage du rutoside dans les urines. En la modifiant un peu, elle permet une séparation des dérivés flavoniques et un dosage colorimétrique après leur remise en solution par la réaction de la cyanidine.

Nous en avons tenté l'application aux préparations à base de racine de Régliſſe, après la détermination de la courbe d'absorption avec la flavanone pure.

1) *Dosage de la flavanone pure après adsorption sur gel d'alumine :*

M^{lle} J. CORNILLEAU part d'une prise d'essai de 1 à 4 ml de solution à étudier, renfermant de 1 à 4 mg de dérivé flavonique. On verse dans un tube à centrifuger, on ajoute 3 ml de solution de chlorure d'aluminium* à 15^o₀, on agite puis on mélange soigneusement avec 0,5 ml d'ammoniaque à 20^o₀. Le gel d'alumine se forme, adsorbant la flavanone (le gel est jaune).

Après dilution à 10 ml et homogénéisation, le tube est centrifugé à 5.000 tours par minute pendant cinq minutes. Le liquide surnageant est décanté et on dissocie le gel. On le lave avec 2 ml d'eau additionnée de deux gouttes d'ammoniaque, ajoute 8 ml d'eau, on agite fortement et on centrifuge ; on lave de nouveau si nécessaire. Puis on ajoute enfin au culot de centrifugation 2 ml d'acide chlorhydrique à 32° BAUMÉ. Après 10 minutes de repos pour obtenir une bonne dissolution, on complète exactement à 5 ml et effectue la réaction de la cyanidine avec 0,075 g de tournure de magnésium.

Afin de réaliser sensiblement les mêmes conditions expérimentales

* Chlorure d'aluminium hydraté.

que précédemment, le gel a été repris par 2,5 ml d'acide chlorhydrique et la solution a été complétée ensuite à 5 ml avec de l'alcool à 60° avant l'addition de magnésium. Or la coloration obtenue était rose pâle et la quantité de substance retrouvée inférieure à la quantité mise en œuvre.

Après plusieurs essais systématiques, les remarques suivantes se sont imposées : nécessité d'augmenter la quantité de chlorure d'aluminium et d'ammoniaque afin d'adsorber la flavanone en totalité : laver avec l'alcool à 60° et non à l'eau ; reprendre le culot de centrifugation par une plus grande quantité d'acide chlorhydrique.

Nous avons finalement adopté la technique suivante :

— la prise d'essai contenant de 1 à 4 mg de flavanone est ajustée à 3 ml avec de l'alcool à 60° ;

— ajouter 4 ml de solution de chlorure d'aluminium hydraté à 15 % : puis 1 ml d'ammoniaque à 20 % pour former le gel. Homogénéiser : centrifuger ; décanter ;

— laver avec 2 à 3 ml d'alcool à 60° (4 ml au maximum) ;

— reprendre par 5 ml d'acide chlorhydrique pur à 32° BAUMÉ ;

— ajouter directement dans le tube à centrifuger 0,10 g de tournure de magnésium. Quand le dégagement d'hydrogène a pris fin, ajuster le volume à 10 ml dans une éprouvette à l'aide d'alcool à 60° sans omettre de rincer le tube à centrifuger avec quelques gouttes d'alcool à 60°. Transvaser enfin dans le tube du photocolorimètre pour effectuer la lecture.

Le filtre utilisé est toujours le filtre vert-jaune (550 μ) (solution rose-violacé). La coloration est moins stable que celle de la cyanidine directe. La lecture doit être effectuée aussitôt après le refroidissement du tube (10 minutes environ). Pour de grandes dilutions la coloration diminue encore plus rapidement.

Détermination de l'absorption en fonction de la concentration :

Les déterminations ont été faites avec des prises d'essai de 0,10, 0,15, 0,20 et 0,25 ml de solution à 1 %, contenant donc de 1 mg à 2,5 mg de substance. Les manipulations sont exécutées conformément à la technique décrite ci-dessus.

Les résultats obtenus ont permis de dresser la courbe B de la figure n° 10 en portant toujours en abscisse la quantité de substance exprimée en mg et en ordonnée la densité optique correspondante. Cette courbe, ne présentant pas de point d'inflexion montre que la réaction ainsi réalisée suit la loi de BEER-LAMBERT et qu'elle est applicable au dosage

pour des quantités de substance comprises entre 1 mg et 2,5 mg.
Le tube témoin est rempli du réactif seul.

2) *Applications à des teintures de racine de Réglisse :*

L'échantillon à étudier est broyé finement. On en prépare une teinture au 1/10 par macération dans de l'alcool à 60° en plaçant à l'étuve à 37° pendant 24 heures. Après filtration, une prise d'essai déterminée est soumise à l'adsorption sur gel d'alumine dans les conditions indiquées plus haut.

Un témoin est préparé avec la même quantité de teinture qui présente une coloration propre ; il est soumis aux mêmes manipulations sauf l'addition de tournure de magnésium.

Résultats : Teneur en flavanone des échantillons étudiés :

1^{er} échantillon : 2,8 %

2^e échantillon : 3,16 %

Racine n° 8 : 2,63 %

Nous regrettons de n'avoir pu appliquer ce dosage à tous les échantillons dont nous disposions mais nous espérons le faire dans un avenir prochain.

II. — Dosage de l'iso-liquiritoside

La réaction de la cyanidine utilisée pour le dosage du liquiritoside est inapplicable à la chalcone.

Pour cette dernière substance, la réaction colorée la plus sensible et la plus stable est celle de WILSON ; la coloration développée jaune fluorescent pourrait être à la base d'un dosage fluorimétrique, ce qui nécessiterait un appareillage spécial. Aussi un essai de dosage gravimétrique a-t-il été réalisé par précipitation à l'état de 2-4 dinitrophénylhydrazone. En effet, dans le noyau chalconique, la réactivité du carbonyle du cycle ouvert est accrue et il donne une hydrazone stable. Quelques dinitrophénylhydrazones de flavanones ont également été décrites en 1951 par DOUGLASS et collaborateurs (41), notamment celle de la liquiritigénine. Cependant, un essai de précipitation de l'hétéroside flavanonique pur en solution aqueuse à 1 %, par la dinitrophénylhydrazine, a été négatif, alors que la chalcone est précipitée dans les mêmes conditions.

A. — ETUDE DU RÉACTIF

D'après PESEZ et POIRIER (110) la 2-4 dinitrophénylhydrazine donne avec les cétones des hydrazones stables, colorées en jaune ou en rouge.

On opère le plus souvent en présence d'acide chlorhydrique, mais on peut aussi choisir les acides sulfurique et phosphorique.

Dans le cas présent deux formules de réactifs ont été retenues :

Réactif 1)

1 g *m*-dinitrophénylhydrazine,
38 ml eau,
38 ml alcool 95°,
10 ml acide sulfurique.

Réaction 2), d'après JANOT et MOUTON (74) :

1 g *m*-dinitrophénylhydrazine,
100 ml acide sulfurique aqueux à 10 % en poids.

B. — ESSAIS DE MESURE

Après avoir vérifié que la flavanone pure ne précipitait pas dans ces conditions, un mélange flavanone-chalcone renfermant 40 % de flavanone (détermination colorimétrique par la réaction de la cyanidine) a été traité.

Des solutions à 1 % dans l'eau et l'alcool à 60° ont été utilisées. 5 ml de chaque solution sont mis en contact à froid, à l'obscurité, avec respectivement 5 ml de chacun des réactifs 1 et 2. Après 24 heures les précipités sont recueillis par centrifugation dans des tubes tarés. Ils sont lavés avec de l'eau sulfurique puis séchés sous vide et pesés. Nous avons remarqué dès le mélange que la précipitation en phase aqueuse est beaucoup plus rapide qu'en phase hydro-alcoolique.

Les résultats ci-dessous sont ramenés à 10 ml de solution à 1 % correspondant à 0,10 g de substance brute qui renferme 40 % de flavanone, soit 0,06 g de chalcone :

Solution aqueuse 1 % + Réactif 1	Solution aqueuse 1 % + Réactif 2	Solution hydro-alcool. 1 % + Réactif 1	Solution hydro-alcool. 1 % + Réactif 2
0,055 g	0,058 g	0,036 g	0,049 g

Conclusion :

Le dosage de la forme chalconique n'a encore fait l'objet que de ces essais limités. Nous nous proposons de le reprendre de manière plus approfondie, en faisant varier les différents facteurs (concentration, température, etc...) et d'étudier ses possibilités d'extension à l'essai de la poudre et de l'extrait de Réglisse.

CHAPITRE III

CARACTÉRISATION ET DOSAGE DE LA GLYCYRRHIZINE

On désigne, nous l'avons vu, sous le nom de glycyrrhizine, un principe sucré constitué par un mélange de différents sels minéraux de l'acide glycyrrhizique. Cet acide appartient au groupe des saponines et résulte de la combinaison d'une molécule d'acide glycyrrhétique avec deux molécules d'acides uroniques (acide glyceuronique, galacturonique ou mannuronique). L'acide glycyrrhétique possède une structure triterpénique et s'apparente à l'acide oléanolique et à la β -amyrine.

La recherche de la glycyrrhizine et certaines méthodes de dosage de cette substance reposent sur des réactions colorées dues soit aux groupements uroniques, soit au noyau triterpénique. Nous avons examiné quelques-unes de ces réactions dans le but de mettre en évidence la glycyrrhizine dans diverses préparations de Réglisse et avons ensuite comparé les techniques de dosage les plus couramment utilisées jusqu'à ce jour.

A. — Caractérisation de la Glycyrrhizine

Quelques essais de caractérisation de la glycyrrhizine en chromatographie sur papier ne nous ont pas donné de bons résultats (voir p. 77 et 87). Nous avons passé en revue les principales réactions colorées proposées par différents auteurs pour cette substance.

I. — Réactions colorées dues aux groupements uroniques

Les réactions proposées par différents auteurs ont été effectuées comparativement sur un échantillon de glycyrrhizine pure (plus exactement de glycyrrhizate acide de potassium), sur de la glycyrrhizine commerciale qui se présente en paillettes noirâtres et dénommée aussi glyzine, enfin sur les dérivés flavoniques retirés de la Réglisse et qui existent souvent dans la glyzine commerciale.

1) En solution dans l'acide sulfurique concentré, la glycyrrhizine pure prend une coloration jaune intense qui, après léger chauffage, passe au rouge violacé. Avec la glycyrrhizine commerciale, la coloration est brunâtre ; elle est jaune foncé avec les dérivés flavoniques.

2) Des réactions colorées, avec les aldéhydes en milieu acide, ont été décrites déjà par plusieurs auteurs : BERTOLO (15), VIRATELLE (142), WIEST (147). BERTOLO a donné diverses réactions en 1925. L'addition, à une solution sulfurique de glycyrrhizine pure, d'une goutte de solution aqueuse à 1 % de pipéronal, détermine l'apparition d'une coloration rouge vineux, virant au violet puis se troublant.

La même réaction n'a été observée ni avec la glycyrrhizine commerciale, ni même avec les dérivés flavoniques qui, dans ces conditions, ne donnent qu'une teinte brunâtre.

3) Si l'on remplace la solution par des cristaux de pipéronal, on observe, au point de contact, une coloration verdâtre. Celle-ci, après chauffage, devient rouge puis violet intense. La réaction n'est pas observée avec la glycyrrhizine commerciale. Avec les dérivés flavoniques, les cristaux de pipéronal prennent une légère coloration violacée.

4) La solution de glycyrrhizine pure, par addition de quelques cristaux de vanilline ou d'une solution alcoolique à 1 % de cette même substance, prend aux points de contact une coloration violacée assez stable ; cette réaction a été appliquée par WIEST (147) au dosage de la glycyrrhizine.

Avec la glycyrrhizine commerciale une coloration rouge violacé se produit qui n'a pas lieu avec les dérivés flavoniques. Elle présente donc une certaine spécificité. Signalons que si l'on ajoute seulement de l'acide sulfurique à la solution alcoolique de vanilline, celle-ci ne se colore qu'en jaune.

5) L'addition, à une solution sulfurique de glycyrrhizine pure, d'une solution alcoolique à 1 % d'aldéhyde salicylique, donne une coloration rouge sang qui vire ensuite au violet. Une coloration un peu plus brunâtre se développe avec la glycyrrhizine commerciale, qui se produit même en présence de dérivés flavoniques ; un essai témoin sans glycyrrhizine a montré qu'avec l'acide sulfurique concentré seul, l'aldéhyde salicylique devient rose puis rouge vif.

Si l'on opère en milieu phosphorique, aucune coloration n'apparaît.

6) Si l'on remplace l'aldéhyde salicylique par l'aldéhyde cinnamique on obtient, avec la glycyrrhizine pure, une coloration brune, et une

teinte noirâtre avec la glycyrrhizine commerciale, de même qu'avec les dérivés flavoniques. Si la glycyrrhizine est en solution alcoolique, la coloration rose passe du rouge au brun. Mais un essai témoin sans glycyrrhizine montre à peu près la même coloration. Comme précédemment l'acide phosphorique ne peut être utilisé.

7) L'aldéhyde anisique étant employé dans les mêmes conditions détermine, avec la glycyrrhizine pure, une coloration rose corail, rouge, puis violacée : la teinte est violacée avec la glycyrrhizine commerciale, brune avec les dérivés flavoniques. Si la glycyrrhizine est en solution alcoolique, la réaction ne se produit qu'en présence d'une assez forte concentration en acide. Un essai témoin sans glycyrrhizine ne montre aucune coloration. Cette dernière réaction serait donc plus spécifique que les précédentes, néanmoins elle est peu sensible. Enfin en milieu phosphorique, elle est nulle.

Ces réactions s'expliquent par la libération, sous l'influence de l'acide sulfurique, de furfurole à partir de l'acide glycyrrhizique, le furfurole réagissant ensuite avec les différents aldéhydes. Pour WIEST, cependant, la réaction à la vanilline serait due à la présence du groupement OH dans la molécule de l'acide glycyrrhétique et il l'applique, nous le verrons plus loin, au dosage de la glycyrrhizine.

Elles manquent évidemment de spécificité. Aucune d'entre elles ne possède, en outre, une sensibilité permettant la recherche de traces de glycyrrhizine au sein d'un mélange.

II. — Réactions colorées dues au noyau triterpénique

La séparation par chromatographie sur papier indiquée par DUTTA (43) pour les saponines a tout d'abord été pratiquée. Après développement du chromatogramme, sur papier Whatman n° 1, par la méthode ascendante et dans le butanol acétique de PARTRIDGE, le papier est séché à l'air, puis révélé à l'aide d'une solution récemment préparée de métaperiodate de sodium à 2 % dans l'eau (4 parties), additionnée de 1 partie de solution aqueuse à 1 % de permanganate de potassium, renfermant 2 % de carbonate disodique. Après révélation, le papier est lavé à l'eau ordinaire afin de décolorer le fond du chromatogramme. Il est ensuite séché à l'air. Les taches de saponines doivent apparaître en brun sur fond blanc. Aucune coloration n'est obtenue avec la glycyrrhizine pure en solution à 1 % et pour des taches de 5 mm³, ni avec la glycyrrhizine commerciale.

Après cet échec, une série de réactions colorées des triterpènes et

saponines triterpéniques signalées par STEINER et HOLTZEM (131) ont été essayées. Les unes peuvent être effectuées directement avec la glycyrrhizine, les autres exigent l'acide glycyrrhétique parce qu'elles doivent être réalisées en solution chloroformique.

a) GLYCYRRHIZINE

1) *Réaction de Salkowski* :

Quelques cristaux de glycyrrhizine pure, additionnés de quelques ml d'acide sulfurique pur, donnent une coloration jaune vif, obtenue également avec la glycyrrhizine commerciale.

2) *Réaction de Liebermann* :

Quelques cristaux de glycyrrhizine pure (insoluble dans le chloroforme) sont additionnés de 1 ml d'anhydride acétique et de deux gouttes d'acide sulfurique. Une coloration rose apparaît et vire au jaune brun. La glycyrrhizine commerciale donne une coloration brune.

3) *Réaction de Noller, Smith, Harris et Walker* (131) :

Au cours de la préparation des chlorures acides de quelques acides triterpéniques, ces auteurs ont remarqué qu'ils obtenaient des solutions diversement colorées s'ils utilisaient le chlorure de thionyle technique, et des solutions incolores s'ils employaient le réactif pur. Après analyse qualitative du réactif, ils s'aperçurent qu'il renfermait des traces de métaux. Ils effectuèrent alors plusieurs essais en additionnant le chlorure de thionyle pur de traces de différents sels métalliques. C'est ainsi qu'une solution de chlorure stannique à 0,01 % dans du chlorure de thionyle pur produit différentes colorations selon le dérivé triterpénique en présence (acide oléanolique, α et β amyrine, hédéragénine, etc...).

N'ayant pu nous procurer du chlorure de thionyle pur, nous avons préparé le réactif avec le produit technique. La solution était brunâtre. En présence de glycyrrhizine pure elle devient jaune, puis rosée au bout de 15 minutes. Avec la glycyrrhizine commerciale, on observe à peu près les mêmes teintes.

4) *Réaction de Hirschsohn* (131) :

Quelques cristaux de glycyrrhizine pure additionnés de quelques ml d'acide trichloracétique sont chauffés au bain-marie. Il se développe une coloration rose vif pendant le chauffage, disparaissant rapidement ensuite. Avec la glycyrrhizine commerciale la coloration passe du jaune au brun foncé.

5) *Réaction de Brieskorn et Briner* (20) :

Ces auteurs ont mis au point une réaction colorée des triterpènes, suffisamment sensible pour permettre leur localisation microscopique dans les coupes végétales. Ils ont remarqué que l'acide sulfurique altérait les coupes, masquant la coloration rouge violacée due aux substances triterpéniques, alors que l'acide chlorosulfurique (ou chlorhydrine sulfurique) permettait de respecter les cellules végétales. Recherchant un bon solvant pour diluer ce réactif ils fixent leur choix sur le « Sesolvan NK » (BADISCHE ANILIN)*.

Le réactif de BRIESKORN et BRINER comporte 6 ou 7 parties de chlorhydrine sulfurique pour 4 ou 3 parties de Sesolvan NK. En présence de traces de triterpènes, doit apparaître, en quelques secondes, une coloration rouge violacé stable. Un léger chauffage accélère la coloration, mais une température trop élevée la ferait disparaître. Une coloration jaune ou brune indiquerait la présence de stéroïdes.

Nous avons pu nous procurer du Sesolvan, mais nous en ignorons la composition exacte : nous avons préparé le mélange : 6 parties de chlorhydrine sulfurique-4 parties de Sesolvan. En présence de traces de glycyrrhizine pure la solution conserve d'abord sa propre coloration grisâtre, puis elle devient jaune doré, jaune orangé, rose corail au bout de 10 minutes, à la température ordinaire. Après léger chauffage au bain-marie, une magnifique coloration rouge violacé apparaît et reste stable plusieurs heures. En présence de glycyrrhizine commerciale, on remarque à peu près la même gamme de couleurs ; après chauffage, on n'obtient qu'une coloration rouge, sans teinte violacée, car le produit est très impur, mais la coloration est encore nette et peut même être pratiquée directement sur une poudre de Réglisse. Dans ce dernier cas, la teinte obtenue est brun rougeâtre. Enfin le même essai effectué sur les dérivés flavoniques donne une coloration jaune intense.

De toutes les réactions colorées examinées jusqu'ici, c'est la plus sensible ; elle paraît en outre spécifique et peut permettre une caractérisation de la glycyrrhizine dans différentes préparations de Réglisse, notamment dans les différents produits obtenus au cours de l'extraction et de la purification des dérivés flavoniques. Afin de tenter une application à la détection de la glycyrrhizine par chromatographie sur papier, des gouttes de 5 mm³ de solution de glycyrrhizine à 1 % furent déposées sur du papier Arches n° 302, trempé dans le réactif de BRIESKORN et

* Nous remercions la BADISCHE ANILIN d'avoir bien voulu nous envoyer le Sesolvan NK.

BRINER. Mais le réactif, étant très acide, attaque et détruit rapidement le papier. Nous avons cependant noté que la glycyrrhizine pure donnait une tache mauve pâle, la glycyrrhizine commerciale une tache brune, les dérivés flavoniques, jaune vif, et l'extrait de Réglisse, jaune foncé.

b) ACIDE GLYCYRRHÉTIQUE

1) *Réaction de Liebermann :*

Comme avec la glycyrrhizine pure, on obtient une coloration rose, mais elle ne vire pas au brun.

2) *Réaction de Kahlenberg :*

Quelques mg d'acide glycyrrhétique pur dissous dans 1 ml de chloroforme sont additionnés de 2 ml de mélange (à volumes égaux) de pentachlorure d'antimoine et de chloroforme. Il n'apparaît aucune coloration à froid ; à chaud, la solution devient jaune pâle.

3) *Réaction au tétranitrométhane :*

Indiquée par RUZICKA en 1929 : la substance (acide glycyrrhétique pur) est dissoute dans le chloroforme : on ajoute quelques gouttes de solution chloroformique de tétranitrométhane. La coloration est jaune extrêmement pâle.

Une réaction positive serait caractéristique des doubles liaisons conjuguées mais elle serait négative quand les doubles liaisons sont conjuguées avec un groupement carbonyle.

4) *Réaction de Tschugajew :*

L'acide glycyrrhétique pur, en solution chloroformique, est additionné d'un excès de chlorure d'acétyle et porté à ébullition en présence d'un fragment de chlorure de zinc comme déshydratant. Il apparaît une magnifique coloration rouge éosine, stable environ 1 heure, présentant une fluorescence jaune en lumière ultra-violette.

L'acide glycyrrhizique pur, bien qu'insoluble dans le chloroforme, est mis en suspension dans ce solvant et la réaction est effectuée comme ci-dessus. Après un temps de chauffage de quelques minutes, apparaît une coloration rose, qui est obtenue également avec la glycyrrhizine commerciale. Un essai est alors pratiqué sur la poudre de racines en suspension dans le chloroforme. Il apparaît une belle coloration rose corail.

Devant ce résultat, une tache d'acide glycyrrhétique pur est déposée sur papier et ce dernier est trempé dans une solution de chloroforme (2 parties), chlorure d'acétyle (3 parties), portée à l'ébullition au préalable en présence de chlorure de zinc. La bande de papier est séchée à l'étuve

à 100°. La tache apparaît noirâtre sur fond blanc. La réaction n'est donc plus caractéristique dans ces conditions.

Néanmoins si la réaction est difficilement applicable à la chromatographie sur papier, *in vitro*, elle peut être fort utile.

B. — Dosage de la Glycyrrhizine

La glycyrrhizine, qui est restée jusqu'à ce jour le constituant le plus connu de la racine de Réglisse, est également le seul à avoir été dosé. Depuis une cinquantaine d'années, de nombreuses techniques ont été publiées. Notre but n'est pas d'en effectuer un examen complet, déjà fait par ailleurs, notamment par LINZ en 1916 (87), puis par VIRATELLE en 1938 (142) et WIEST en 1949 (147), ces derniers ayant consacré leurs thèses de Doctorat en Pharmacie à l'étude de ce dosage. Personnellement, nous désirions simplement essayer les principales techniques et les appliquer comparativement au dosage des différents échantillons dont nous disposions.

Dès les premiers essais, et de même que nos prédécesseurs, nous nous sommes aperçue que la glycyrrhizine était un élément difficile à doser exactement, tant dans la racine que dans les sucs de Réglisse. En outre, afin d'apprécier la précision de ces méthodes, nous les avons appliquées à un échantillon de glycyrrhizine pure que nous avons dû préparer nous-même à partir de glycyrrhizine commerciale. Nous ouvrons ici une parenthèse au sujet de cette purification.

Au cours d'un premier essai, la glycyrrhizine commerciale est dissoute dans de l'eau chaude. La solution noire est filtrée, et, par addition d'acide sulfurique, il se forme un précipité noir. Ce précipité, lavé à l'eau jusqu'à disparition de l'acidité, est dissous dans le minimum d'ammoniaque diluée. Après évaporation à sec, on obtient des écailles noirâtres de glycyrrhizate d'ammonium. Ce dernier est alors repris par de l'acide acétique et l'on précipite de nouveau l'acide glycyrrhizique avec une solution aqueuse de sulfate de cadmium à saturation. Le nouveau précipité recueilli est mis en suspension dans de l'alcool à 60° ; après avoir fait passer un courant d'hydrogène sulfuré qui décompose le précipité, nous n'avons pas obtenu dans le filtrat de produit sensiblement purifié.

Après cet échec, nous nous sommes adressée à la technique indiquée par VOSS pour la préparation du sel mono-ammoniacal de l'acide glycyrrhizique (145, 145 bis). 100 g de glycyrrhizine commerciale sont dissous à chaud dans 950 ml d'acide acétique. La solution brun noir est laissée au

repos pendant 3 jours. Le dépôt brun formé est recueilli par centrifugation et repris de nouveau par 500 ml d'acide acétique. Après repos et centrifugation, le nouveau précipité est séché sous vide en présence de potasse. On obtient 18,25 g d'une poudre brun clair que l'on fait recristalliser 2 fois dans l'alcool à 95° bouillant. Les solutions alcooliques chaudes sont filtrées sur entonnoir à filtration chaude, la première fois sur noir végétal activé afin de décolorer la solution.

Après un repos de 48 heures, on recueille par centrifugation un beau précipité cristallisé en houppes blanches, d'aspect soyeux. Celui-ci est séché sous vide en présence de potasse (Rendement 4%). Le produit est lavé à l'éther pour éliminer l'acide acétique. A partir de ce glycyrrhizinate d'ammonium cristallisé, l'acide glycyrrhizique a été préparé. Le produit est mis en suspension dans 300 ml d'acide sulfurique à 1% en poids, puis chauffé au bain-marie. La solution devient limpide, se trouble peu à peu et, au bout d'une heure environ, un précipité blanc se sépare au fond du ballon. Après centrifugation, il est lavé à l'eau distillée et séché sous vide. Cependant, d'après Voss, cet acide renfermerait encore 10% du sel ammoniacal. Afin de l'en débarrasser, il est mis à bouillir 3 fois avec 60 ml d'eau distillée. Chaque fois, le précipité est recueilli par centrifugation. Nous avons constaté que plus le produit est pur, plus il prend l'aspect colloïdal et devient difficile à centrifuger. Nous avons recueilli 1,25 g. Les eaux mères étant encore très troubles, nous avons essayé de récupérer encore un peu de substance :

- après repos au frigidaire, aucune précipitation n'est apparue ;
- après addition de divers solvants organiques (éther, acétone, chloroforme, dioxane, benzène) aucune floculation n'a eu lieu ;
- après relargage par du chlorure de sodium et reprise par l'éther très peu de substance se dissout. Le résidu d'évaporation est minime, mais ce procédé resterait cependant le meilleur ;
- après précipitation par l'acide sulfurique et extraction étherée, aucun résidu n'est obtenu ;
- enfin l'ultracentrifugation elle-même ne nous a conduit à aucun résultat.

Nous n'avons donc obtenu à partir de 100 g de glycyrrhizine ammoniacale que 1,25 g d'acide glycyrrhizique pur, à côté duquel, au cours de l'hydrolyse du sel ammoniacal, s'est probablement formé un peu d'acide glycyrrhétique. Ce dernier, soluble dans le chloroforme, est éliminé par lavage à l'aide de ce solvant.

L'acide glycyrrhizique pur est alors redissous dans 25 ml d'alcool à 95°. Par addition de quelques gouttes de solution alcoolique ammonia-

cale, il apparaît un précipité blanc amorphe. Après addition d'un peu d'alcool et chauffage au bain-marie, le précipité devient cristallin. On recueille finalement 0,95 g de glycyrrhizate acide d'ammonium pur.

Deux méthodes de dosage reposent sur la précipitation de l'acide glycyrrhizique par un acide minéral fort, conduisant à un dosage gravimétrique : la méthode adoptée par VIRATELLE et celle du Codex 1949. Deux autres sont basées sur l'hydrolyse de la glycyrrhizine, conduisant à un dosage colorimétrique : la méthode de FUCHS publiée en 1947 dose colorimétriquement les acides uroniques libérés, et la méthode de WIEST évalue par une autre réaction colorée, l'acide glycyrrhétique libéré et extrait.

II. — Méthode de Viratelle (142)

L'auteur, après un examen critique comparatif des nombreuses méthodes déjà publiées, précise les solubilités de la glycyrrhizine pour son extraction à partir des milieux complexes que constituent un suc et même une poudre de Réglisse, puis ses meilleures conditions de précipitation afin de permettre un dosage pondéral. Ce dernier peut être ainsi pratiqué :

- sur le suc ou extrait aqueux desséché, selon la définition du Codex ;
- sur l'extrait, résultat d'une double macération aqueuse et ammoniacale de la racine ;
- sur la glycyrrhizine commerciale, écailles brillantes, noirâtres, obtenues par précipitation acide des liqueurs extractives aqueuses de la racine de Réglisse, suivie d'une redissolution ammoniacale du précipité et, enfin d'une évaporation ;
- sur la poudre de racine de Réglisse.

1) PRINCIPE :

Le substrat est mis en contact avec de l'alcool à 75° (la poudre étant au préalable lavée à l'éther). Après évaporation des liqueurs alcooliques, on précipite, dans le résidu repris par l'eau, l'acide glycyrrhizique, acide faible, par l'acide sulfurique. Le précipité, lavé, est redissous dans l'alcool à 95° bouillant. Ce solvant ayant enfin été évaporé, le résidu est pesé.

2) TECHNIQUE :

Nous avons, à notre disposition, neuf échantillons de racines de Réglisse d'origines géographiques différentes, ainsi que trois échantillons de sucs. Le dosage fut enfin effectué sur la glycyrrhizine pure.

a) *Dosage sur la poudre :*

(Thèse VIRATELLE p. 80-81). Une prise d'essai de 2,50 g environ est lavée à l'éther dans un tube à centrifuger jusqu'à ce que l'éther soit incolore. Après séchage à l'air libre, la poudre est laissée une nuit en contact avec 75 ml d'alcool à 75°. On centrifuge, décante et lave trois fois avec 20 ml d'alcool à 75°. Les solutions réunies sont évaporées jusqu'à consistance sirupeuse. Le résidu est alors repris par 10 ml d'eau et la précipitation effectuée à l'aide de 0,40 ml d'acide sulfurique officinal. Après un repos de douze heures à la glacière, le précipité est centrifugé et lavé deux fois avec 5 ml puis 3 ml d'eau glacée saturée d'éther. L'acide glycyrrhizique ainsi obtenu est dissous dans 25 ml d'alcool à 95° bouillant ; le tube est lavé deux fois avec 10 ml d'alcool à 95° et les liqueurs alcooliques réunies sont évaporées à sec dans un cristalliseur taré. On pèse après dessiccation à l'étuve à 100° à poids constant.

Nos déterminations furent faites sur des prises d'essai non desséchées, l'humidité des échantillons ayant été déterminée par ailleurs.

Les résultats obtenus sont consignés dans le tableau situé à la fin de cette étude, permettant ainsi de comparer rapidement les chiffres fournis par les différentes méthodes utilisées.

b) *Dosage sur le suc :*

(D'après VIRATELLE p. 67). Une prise d'essai de 2,50 g environ (exactement déterminée) est mise en contact avec 20 ml d'eau distillée tiède, utilisée par petites fractions successives afin de mettre tout le suc en suspension. On ajoute 67 ml d'alcool à 95°, réalisant finalement un titre alcoolique d'environ 75°. Après un repos de six heures au moins, on centrifuge, décante les liqueurs alcooliques et lave le résidu quatre fois avec 20 ml d'alcool à 75°. Toutes ces liqueurs réunies sont évaporées à consistance pâteuse. Le résidu est repris par 30 ml d'eau distillée (en filtrant si besoin). On précipite alors l'acide glycyrrhizique par addition de 0,50 ml d'acide sulfurique pur officinal et on laisse reposer à la glacière. Le précipité est centrifugé, lavé avec deux fois 5 ml d'eau glacée saturée d'éther, et traité enfin par 25 ml d'alcool à 95° bouillant. Le tube est lavé avec deux fois 10 ml d'alcool bouillant, les liqueurs alcooliques sont réunies et mises de côté.

Les solutions acides de précipitation sulfurique sont conservées et réunies aux deux eaux de lavage. Après saturation par l'ammoniaque, elles sont concentrées à 4 ou 5 ml et complétées ensuite à 10 ml dans un tube à centrifuger. On ajoute alors 0,25 ml d'acide sulfurique et traite comme ci-dessus. Toutes les liqueurs alcooliques sont finalement

réunies et évaporées à sec dans un cristalliseur taré. La dessiccation est achevée à l'étuve à 100° et le résidu est pesé.

c) *Dosage sur la glycyrrhizine pure :*

0,10 g de glycyrrhizate acide d'ammonium pur sont dissous dans 10 ml d'eau afin de réaliser la précipitation dans les conditions admises par VIRATELLE pour les précédents dosages. Mais, dans ce cas, 0,50 ml d'acide sulfurique sont insuffisants pour obtenir une précipitation complète ; 2 ml sont nécessaires. Après repos au frigidaire, le précipité est centrifugé et lavé avec 5 ml d'eau glacée saturée d'éther, ce qui provoque sa redissolution partielle. Un autre essai est donc effectué et le précipité, centrifugé, non lavé, est repris par 25 ml d'alcool à 95° bouillant, la solution étant évaporée dans un cristalliseur taré. Sous l'influence de la concentration sulfurique élevée, le résidu charbonne. Un troisième essai, sans reprise par l'alcool bouillant est pratiqué. Le précipité est simplement desséché sous vide. Il est impossible de le recueillir quantitativement car il devient sirupeux et noirâtre.

3) OBSERVATIONS :

Cette technique de dosage est facile à réaliser mais les résultats élevés qu'elle donne font douter de sa spécificité. Il est probable que l'extraction alcoolique préliminaire de la poudre ou du suc entraîne des substances précipitant avec la glycyrrhizine par l'acide sulfurique ; le résidu final recueilli, toujours coloré en brun, semble impur.

Le dosage dans les conditions indiquées par l'auteur s'est montré inapplicable au glycyrrhizate d'ammonium pur, et il n'a pas été possible de vérifier que la précipitation de la glycyrrhizine était bien quantitative par cette méthode.

II. — Méthode de la Pharmacopée française 1949

Méthode gravimétrique également, elle figure au Codex 1949 (p. 320-321) à l'article « Extrait brut de Réglisse » (ou suc de Réglisse). L'ayant appliquée à trois échantillons de sucs, nous avons essayé de l'utiliser également pour le dosage de la glycyrrhizine dans les poudres de Réglisse. Mais l'application en est difficile et, les conditions décrites n'étant plus respectées, nous avons abandonné cet essai.

1) PRINCIPE :

L'extraction de la glycyrrhizine s'opère en milieu aqueux ammoniacal. La précipitation est effectuée à l'aide d'acide sulfurique : le

précipité recueilli est repris par de l'eau ammoniacale qui est évaporée ensuite à sec. Le résidu est pesé.

2) TECHNIQUE :

a) *Dosage sur le suc :*

Dissoudre 3 g d'extrait préalablement desséché à 100° dans 30 ml d'eau distillée additionnés de cinq gouttes d'ammoniaque officinale. Filtrer et recueillir 20 ml du filtrat correspondant à 2 g du produit desséché. Ajouter à ce filtrat 2,5 ml d'acide sulfurique officinal. Laisser en contact 24 heures. Décanter sur un filtre à plis le liquide limpide. Laver le résidu, sur le même filtre, avec 30 ml d'eau distillée employés en plusieurs fois. Le dissoudre alors dans 2 ml d'ammoniaque officinal. Laver fiole et filtre avec de l'eau distillée contenant cinq gouttes d'ammoniaque pour 10 ml jusqu'à ce que le liquide filtre incolore. Evaporer le filtrat au bain-marie dans un cristalliseur taré qui sera ensuite placé une heure à l'étuve à 100° et peser.

b) *Essai sur la glycyrrhizine pure :*

0,10 g de glycyrrhizate acide d'ammonium sont dissous, comme il est indiqué ci-dessus, dans 30 ml d'eau additionnés de V gouttes d'ammoniaque. La précipitation demande ici aussi une concentration en acide sulfurique supérieure à celle qui est indiquée pour le dosage dans le suc : 4, 5 ml sont nécessaires. Après repos, le précipité est centrifugé (pour éviter des pertes qu'entraîne la décantation simple). Bien que le liquide surnageant soit trouble, il ne précipite plus après nouvelle addition d'acide sulfurique. Un premier lavage à l'eau redissout une grande partie du précipité (comme dans l'application de la technique de VIRATELLE à la glycyrrhizine pure). Un autre essai sans lavage aqueux est donc effectué. Le précipité est directement repris par 2 ml d'ammoniaque, le tube est rincé avec de l'eau ammoniacale et les solutions réunies sont évaporées à sec au bain-marie dans un cristalliseur taré.

Pour une prise d'essai de 0,10 g, il a été recueilli 0,24 g de résidu blanc ! Cet excès considérable est vraisemblablement dû à la formation de sulfate d'ammonium. Le précipité, qu'il n'est pas possible de laver sans le redissoudre en partie, adsorbe sûrement une certaine quantité d'acide sulfurique.

Comme pour la méthode de VIRATELLE, l'application à la glycyrrhizine pure et par suite le contrôle de la technique n'ont donc pas été possibles.

3) OBSERVATIONS :

Différentes remarques s'imposent.

La filtration des liqueurs d'extraction ammoniacales, afin de recueillir

la portion aliquote de 20 ml, est très laborieuse. Etant donné que le suc n'est pas entièrement solubilisé, le filtre est peu à peu colmaté par une bouillie épaisse et il est très long et parfois impossible de recueillir 20 ml. En outre, le produit de la précipitation sulfurique est parfois si important que 2 ml d'ammoniaque sont insuffisants pour le solubiliser. Enfin, il est recommandé de laver fiole et filtre à l'eau ammoniacale jusqu'à ce que le filtrat soit incolore ; il est certain que la coloration jaune des eaux de lavage est due bien plus aux dérivés flavoniques présents qu'à la glycyrrhizine elle-même, la glycyrrhizine pure se colorant faiblement en milieu ammoniacal.

Le Codex préconise en outre d'ajouter 0.04 g au poids obtenu, chiffre qui correspondrait à la quantité d'acide glycyrrhizique restée en solution dans les eaux mères et les eaux de lavage. Le total ainsi obtenu correspond, en raison de la portion aliquote prélevée, à la quantité de glycyrrhizine contenue dans 2 g de suc.

Pour les trois dosages effectués, nous avons considéré que le premier (effectué sur le suc d'Espagne) correspondait à la totalité de la prise d'essai car la filtration a permis de recueillir à peine 20 ml (2,31 g de résidu pesé en fin de dosage). Les chiffres trouvés (se reporter au tableau) sont très élevés. La technique permet l'extraction de beaucoup d'impuretés accompagnant la glycyrrhizine. Elle manque de spécificité et de précision.

III. — Méthode de Fuchs (51)

Cette méthode colorimétrique dose les acides uroniques libérés après hydrolyse de la glycyrrhizine. L'auteur a décrit la technique pour le dosage dans la poudre de Réglisse : en diminuant la prise d'essai, nous l'avons utilisée pour le dosage dans les sucs. La courbe étalon fut réalisée avec de la glyceulactone pure.

1) PRINCIPE :

La drogue pulvérisée est épuisée par de l'alcool chlorhydrique et la glycyrrhizine précipitée par l'acétate de plomb. Elle est alors soumise à l'hydrolyse sulfurique et la réaction colorée est effectuée sur cette solution aqueuse acide en présence de naphtorésorcinol et d'acide chlorhydrique concentré. La coloration, due aux acides uroniques, est soluble dans l'éther. Elle est mauve et l'auteur indique d'effectuer la lecture à la longueur d'onde de 565 m μ . Nous avons utilisé le filtre n° 7 (570 m μ) du photocolorimètre « Electrosynthèse », filtre pour lequel l'absorption était maximum.

2) TECHNIQUE :

a) *Courbe étalon :*

La courbe étalon est tout d'abord déterminée à l'aide de doses croissantes de glycurolactone pure prise comme témoin. La réaction colorée étant sensible, ces doses variaient entre 10 et 15 γ . La prise d'essai est complétée à 2 ml, puis additionnée de 2 ml de solution aqueuse de naphthorésorcinol à 0,1 % fraîchement préparée et de 2 ml d'acide chlorhydrique concentré ($d = 1,19$). Après chauffage au bain-marie bouillant pendant 4 heures dans un ballon surmonté d'un long tube formant réfrigérant, le mélange est refroidi rapidement sous un courant d'eau froide. On lui ajoute alors 2 ml d'alcool à 95° et verse le tout dans une petite ampoule à décanter ; on extrait avec 10 ml d'éther pur sans peroxyde, puis 5 ml. Les solutions éthérées colorées sont recueillies, ajustées à 15 ml avec de l'éther pur et la lecture photocolorimétrique est effectuée comparativement à un témoin fait dans les mêmes conditions, mais sans glycurolactone.

b) *Dosage sur la poudre :*

Une prise d'essai de l'ordre de 0,20 g est pesée avec précision. Elle est épuisée pendant une heure à l'aide de 50 ml d'un mélange de 100 parties d'alcool à 50° et 2 parties d'acide chlorhydrique à 2 %, en l'agitant mécaniquement. Après filtration, on prélève à la pipette 10 ml du filtrat dans un tube à centrifuger. On ajoute 0,4 ml de solution aqueuse saturée d'acétate neutre de plomb. On mélange bien et centrifuge le précipité formé. Le liquide surnageant est éliminé et le précipité lavé deux fois avec 10 ml d'alcool à 50°. Le résidu est alors mis en suspension dans 30 ml d'acide sulfurique à 3 % en poids et porté pendant 4 heures au bain-marie bouillant dans un ballon surmonté d'un réfrigérant. Après refroidissement le liquide est transvasé dans une fiole jaugée de 50 ml et ajusté à ce volume. On laisse reposer une nuit afin que le précipité plombique se décante bien. Après filtration, on prélève alors à la pipette 0,5 à 2 ml de liquide (personnellement nous avons prélevé 1 ml dans tous les cas). On complète le volume à 2 ml avec de l'eau et ajoute 2 ml de solution aqueuse de naphthorésorcinol à 0,1 % récemment préparée et filtrée, puis 2 ml d'acide chlorhydrique concentré ($d = 1,19$). Le tout est chauffé 4 heures au bain-marie bouillant dans un ballon surmonté d'un réfrigérant à air, en agitant de temps en temps. Après refroidissement rapide sous un courant d'eau froide, la coloration formée après addition de 2 ml d'alcool à 95° est épuisée dans une petite ampoule à décanter par 10,

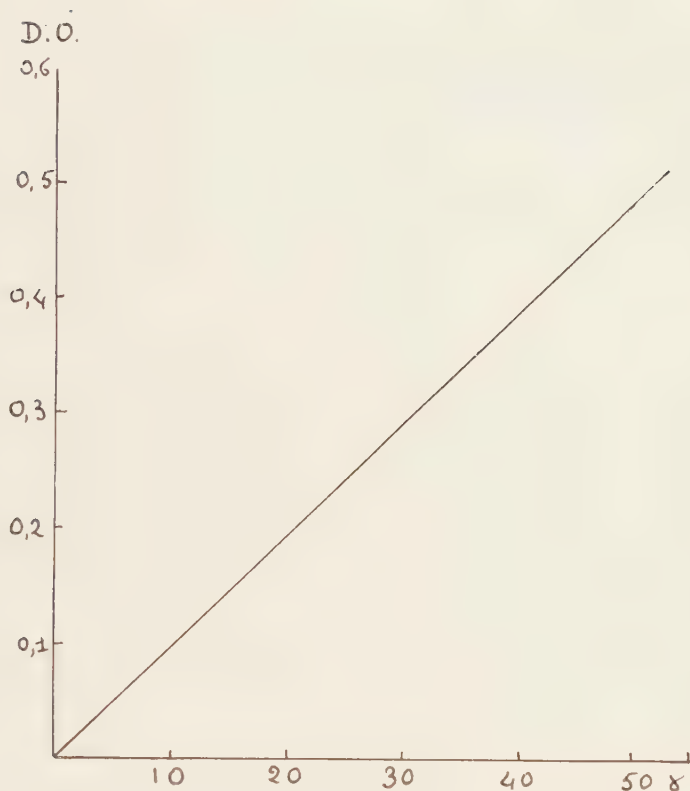


FIGURE 11. — Dosage colorimétrique de la glycyrrhizine par la méthode de FUCHS :

en abscisse : concentration en glycyrrhizine ;
en ordonnée : densité optique.

puis 5 ml d'éther pur sans peroxyde. Les solutions étherées sont réunies et complétées à 15 ml, si nécessaire, avec un peu d'éther. Si la solution est trouble, on peut clarifier en agitant avec un peu de sulfate de sodium anhydre. La lecture est enfin effectuée comparativement avec un témoin (naphtorésorcinol et acide chlorhydrique) fait dans des conditions identiques.

c) Dosage sur le suc :

Une prise d'essai de l'ordre de 0,50 g est exactement pesée. Elle est épuisée avec 50 ml d'alcool à 50° sans acide chlorhydrique qui entraînerait une précipitation de résines. Après filtration, 1 ml de la solution (correspondant à 0,05 g de suc, soit environ le quart de la prise d'essai effectuée sur la poudre) a été prélevée et complétée à 10 ml avec de l'alcool

à 50°. Le dosage a été poursuivi selon les modalités indiquées précédemment.

d) *Dosage sur la glycyrrhizine pure :*

Nous avons effectué le dosage sur une prise d'essai correspondant à 20 γ de glycyrrhizine pure (hydrolyse puis réaction colorée) et trouvé, après calculs, 1,15 g de produit pur pour 1 g, soit une erreur par excès de l'ordre de 15 %.

3) **OBSERVATIONS :**

Cette méthode de dosage présente l'inconvénient d'être assez longue, nécessitant un certain nombre de manipulations. En outre, les résultats exprimés sont toujours en excès. Il est en effet probable que l'hydrolyse acide libère des sucres ou des restes uroniques provenant des autres constituants de la racine (gommes, mucilages, etc...) qui viennent s'ajouter aux acides uroniques libérés par la glycyrrhizine seule.

Toutefois, la réaction colorée due au naphtorésorcinol s'est révélée d'une grande stabilité à la lumière ordinaire ; elle est en outre très sensible puisqu'elle permet de doser des quantités variant entre 10 et 50 γ ; enfin si les manipulations sont longues, elles ne présentent pas de difficultés.

IV. — Méthode de Wiest (147)

Elle dose l'acide glycyrrhétique libéré par hydrolyse de la glycyrrhizine, à l'aide d'une réaction colorée avec la vanilline en milieu sulfurique concentré. La réaction, d'après l'auteur, serait due à la présence d'un OH phénolique sur le noyau triterpénique de la génine. Elle n'est pas spécifique des triterpènes mais peut, en l'absence de stérols, être adaptée à leur dosage. Ce dernier est décrit pour la poudre de Réglisse. WIEST signale que la prise d'essai doit simplement être réduite pour l'appliquer aux sucs ou à la glycyrrhizine commerciale. La courbe étalon fut établie à l'aide d'un acide glycyrrhétique pur*, qui fut comparé à un échantillon témoin que nous avons préparé par hydrolyse de la glycyrrhizine précédemment purifiée.

Celle-ci est hydrolysée par l'acide sulfurique à 1 % en poids, pendant 4 heures à 150-155° (bain d'huile). La solution, limpide au début, se trouble peu à peu et, en fin d'hydrolyse, un produit blanchâtre s'est déposé au fond du ballon. C'est de l'acide glycyrrhétique brut, amorphe,

* Nous remercions les Etablissements ZAN qui nous ont obligeamment fourni cet échantillon.

qui a été lavé à l'eau, comme TSCHIRCH et GAUCHMANN (137) le préconisent, et recristallisé deux fois dans de l'alcool à 50°. Il a été recueilli 0,57 g d'acide glycyrrhétique pur cristallisé (P. F. = 278-280°, bloc Maquenne). La plupart des auteurs ont réalisé cette hydrolyse à l'autoclave : Voss (145, 145 bis) à 130-140°, TSCHIRCH (137), 2 heures à 130-140° avec de l'acide sulfurique à 1 °₀, KARRER (76) et BERGMANN (14) à l'autoclave à 130° pendant 3 heures. Nous avons préféré le bain d'huile, plus commode à utiliser.

1) PRINCIPE :

La réaction utilisée par WIEST est due, nous l'avons vu, à l'action de la vanilline, en milieu sulfurique concentré, sur la fonction phénolique de l'acide glycyrrhétique.

La drogue, pulvérisée, est épuisée par de l'alcool chlorhydrique et la glycyrrhizine est précipitée par l'acétate de plomb. Le précipité est hydrolysé et l'acide glycyrrhétique extrait par le chloroforme. Le résidu d'évaporation est dissous dans de l'acide sulfurique pur et additionné d'une solution alcoolique à 2 °₀ de vanilline. L'intensité de la coloration est mesurée au photocolorimètre. Nous avons toujours utilisé, pour ce dosage, de l'acide sulfurique pur et de l'alcool à 96° (point d'ébullition : 78°).

L'auteur précise qu'il est nécessaire de respecter les conditions opératoires suivantes :

— la dissolution de la vanilline dans l'alcool ainsi que l'addition de la solution sulfurique d'acide glycyrrhétique doivent se faire à l'obscurité, ou, du moins, en lumière très faible ;

— la solution de vanilline doit être préparée extemporanément et conservée dans l'eau glacée pendant et après l'addition de l'acide sulfurique ;

— l'addition de l'acide sulfurique doit être faite à la pipette pendant 30 à 45 secondes, en le faisant couler lentement le long des parois du récipient. Celui-ci est ensuite agité pendant 15 secondes et laissé à refroidir dans le bain d'eau glacée ;

— la lecture est enfin effectuée 20 minutes après, en présence d'un témoin sans acide glycyrrhétique, et à la longueur d'onde de 550 m μ (la coloration développée est bleu violacé). Avec le photocolorimètre « Electro-synthèse » nous avons utilisé le filtre n° 6 (550 m μ), filtre pour lequel l'absorption est maximum.

2) TECHNIQUE :

a) Courbe étalon :

Elle fut établie à l'aide de doses croissantes d'acide glycyrrhétique de 1 à 5 mg. La prise d'essai, exactement pesée, est dissoute dans l'acide sulfurique pur et la solution conservée à l'obscurité. A 25 ml de solution

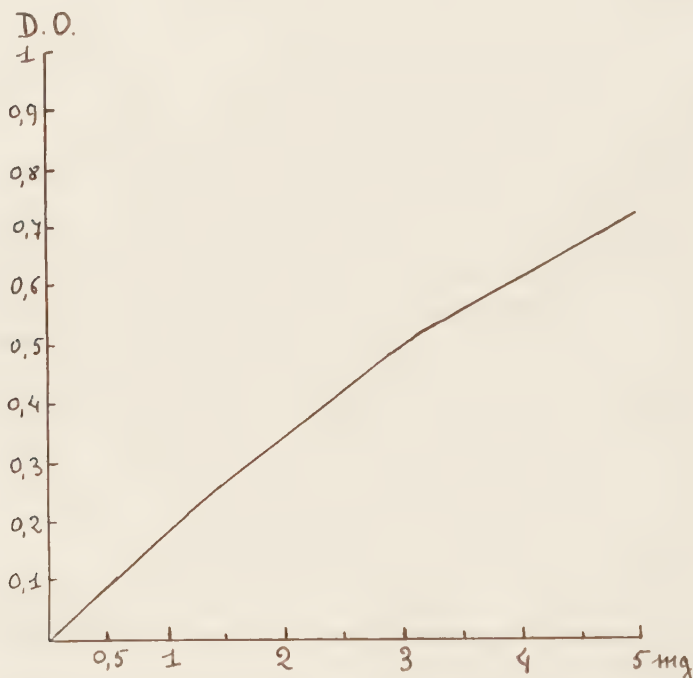


FIGURE 12. — Dosage colorimétrique de la glycyrrhizine par la méthode de WIEST :

en abscisse : concentration en glycyrrhizine ;
en ordonnée : densité optique.

alcoolique de vanilline à 2 % maintenue dans un bain d'eau glacée sont ajoutés, dans les conditions ci-dessus précisées, 5 ml de solution sulfurique. Les lectures sont effectuées comparativement à un témoin sans acide glycyrrhétique, après complet refroidissement.

b) Dosage sur la poudre :

1 g de racine pulvérisée est épuisé par 100 ml d'alcool à 50° renfermant 0,4 ml d'acide chlorhydrique à 10 % en agitant mécaniquement.

Après filtration, 50 ml de solution versés dans un tube à centrifuger sont additionnés de 5 ml de solution aqueuse, saturée d'acétate neutre de plomb. Le précipité est centrifugé, lavé 2 fois par 10 ml d'alcool à 50° puis mis en suspension dans 50 ml d'acide sulfurique à 3 % en poids et hydrolysé pendant 4 heures à reflux au bain-marie bouillant. Après refroidissement, l'acide glycyrrhétique formé est extrait 4 fois en agitant, dans une ampoule à décanter, par 50 ml de chloroforme chaque fois. Les solutions chloroformiques réunies sont lavées avec 10 ml d'eau distillée, déshydratées ensuite en présence de sulfate de sodium anhydre, filtrées et évaporées à sec. Le résidu est finalement desséché pendant 1 heure à l'étuve à 100° avant d'être dissous dans 10 ml d'acide sulfurique concentré, mesurés à la pipette. On prélève 5 ml de cette solution (à la pipette) et les ajoute à la solution de vanilline dans les conditions précédemment indiquées. Si cette prise d'essai est trop forte, elle peut être diminuée, le volume étant complété à 5 ml à l'aide d'acide sulfurique pur.

c) *Dosage sur le suc :*

La prise d'essai ayant été réduite à 0,10 g, le dosage final fut effectué sur 5 ml de solution sulfurique.

d) *Dosage sur la glycyrrhizine pure :*

Celui-ci fut réalisé sur deux prises d'essai de 0,10 g, l'une étant soumise à la précipitation par le plomb puis hydrolysée, l'autre directement hydrolysée. Dans le premier cas, nous n'avons retrouvé que 0,087 g, dans le second cas 0,089 g. C'est donc qu'une légère perte se produit au cours de la précipitation plombique et que, en outre, les résultats, obtenus par cette méthode de dosage, sont inférieurs à ceux de la technique de FUCHS, les écarts se chiffrant entre 11 et 13 % par défaut. On verra d'ailleurs dans le tableau qui suit que plusieurs résultats de dosages sur les racines et sucs sont moins élevés que ceux obtenus par la technique colorimétrique de FUCHS.

3) OBSERVATIONS :

Ce dernier procédé étudié est d'exécution un peu moins longue que celui de FUCHS du fait d'un seul chauffage pendant 4 heures.

Mais la réaction colorée est délicate et de faible stabilité. La coloration verdit de plus en plus à la lumière ordinaire et même à l'obscurité. L'alcool à 96° donne avec le témoin une coloration jaune pâle.

Les conditions opératoires ne sont pas aisées du fait que l'on doit manipuler à l'obscurité presque complète et dans un bain d'eau glacée.

Enfin, la réaction colorée est beaucoup moins sensible que celle des acides uroniques avec le naphtorésorcinol et nécessite encore la manipulation de solutions sulfuriques très concentrées.

Le tableau ci-dessous groupe les résultats obtenus par ces différents modes de dosage pratiqués sur les échantillons dont nous disposons. Ils sont rapportés à 100 g de drogue non desséchée au préalable.

Origine	Méthode de Viratelle	Pharmacopée française 1949	Méthode de Fuchs	Méthode de Wiest
Poudre d'Espagne	6,87		2,86	4,43
— de Grèce	9,28		5,17	3,45
— d'Irak			5,44	5,38
— d'Iran	12,09		6,22	5,67
— d'Italie	8,52		3,51	3,49
— de France (Noirmou- tier)	10,88		4,76	6,47
— de Russie	16,24		7,51	7,34
— de Syrie	11,19		4,71	3,63
— de Turquie	12,91		4,22	6,76
— de Yougoslavie	5,54		3,28	3,49
Suc d'Espagne	27,03	77,00	17,70	16,00
Suc d'Italie	11,29	69,40	12,88	10,18
Suc de Turquie	25,50	52,14	15,68	25,45

Conclusions : Les chiffres obtenus varient donc dans de grandes proportions suivant les méthodes, ce qui fait ressortir les difficultés de dosage d'une substance complexe comme la glycyrrhizine. Si les méthodes de VIRATELLE et même celles de la Pharmacopée française, peu spécifiques, donnent des résultats trop élevés, par contre dans les deux autres méthodes des pertes peuvent avoir lieu au cours de l'hydrolyse.

CHAPITRE IV

ÉTUDE DES SUBSTANCES ŒSTROGÈNES

A. — **Extraction**

Ignorant la structure de la substance active et ne possédant pas de réaction chimique convenable, nous avons tout d'abord, grâce au test d'ALLEN et DOISY, qui sera décrit plus loin, déterminé l'activité œstrogène des extraits obtenus à partir d'un même lot de racine non décortiquée, épuisée par les solvants successifs dans l'appareil de Soxhlet. Nous avons ensuite essayé de séparer la fraction la plus active et tenté en fin une identification par chromatographie sur papier.

I. — Recherche de la fraction active

Un même lot de racines non décortiquées de Réglisse provenant de Turquie a été utilisé pour cette étude.

a) EXTRAIT ALCOOLIQUE TOTAL :

Une fraction de 440 g est épuisée par de l'alcool à 95° dans un appareil de Soxhlet. Après concentration sous pression réduite et à basse température, on obtient 94.30 g d'extrait total de Réglisse. Celui-ci est repris par de l'alcool à 30°, seul solvant possible pour l'essai physiologique, et de telle manière que 1 ml de solution corresponde à 1 g de plante.

Cette solution a été injectée aux rates par voie sous-cutanée (voir p. 132); le test d'ALLEN et DOISY, en étant positif, la présence d'œstrogènes a été démontrée dans cet extrait.

b) EXTRAIT ÉTHÉRO PÉTROLIQUE :

Une autre fraction de 350 g de racines du même lot est épuisée par l'éther de pétrole dans l'appareil de Soxhlet. Les liqueurs sont redistil-

lées à sec et le résidu de 2,50 g (soit 0,7 % de rendement) est redissous dans l'huile d'olive neutralisée de manière que 1 ml de solution huileuse corresponde à 10 g de plante. La présence d'œstrogènes s'est manifestée par un test d'ALLEN et DOISY positif.

c) EXTRAIT CHLOROFORMIQUE :

La drogue épuisée par l'éther de pétrole est séchée puis épuisée au Soxhlet par du chloroforme. Après élimination complète du solvant, le résidu, repris par l'huile d'olive neutralisée, s'est révélé actif.

d) EXTRAIT ALCOOLIQUE DÉLIPIDÉ :

Un lot de 100 g de la même racine est soumis à l'essai suivant : dans l'appareil de Soxhlet, il est d'abord épuisé par l'éther de pétrole pendant 8 heures ; le marc séché est ensuite traité par le chloroforme, jusqu'à décoloration complète de ce solvant. Le marc, séché de nouveau, est donc débarrassé des substances lipidiques par l'éther de pétrole, puis des résines par le chloroforme. Il est enfin lixivié par de l'alcool à 95°. Après avoir éliminé le solvant, le résidu (12,65 g) est redissous difficilement dans le minimum d'alcool à 30°.

Le résultat de cet essai s'est révélé absolument négatif.

Les substances œstrogènes de la racine de Régliasse sont donc en partie extraites par l'éther de pétrole ; l'extraction suivante par le chloroforme en retire les dernières traces. Un extrait délipidé et privé des résines n'a plus aucune action œstrogénique. C'est sur l'extrait éthéro-pétrolique que le fractionnement a été poursuivi.

II. — Fractionnement de l'extrait éthéro-pétrolique

La méthode suivie par BUTENANDT (25) pour extraire la folliculine du résidu de presse des noyaux de Palmier, analogue à celle que cet auteur avait déjà employée pour extraire la folliculine de l'urine de femme enceinte, a été essayée :

3 25 kg de racine de Régliasse ont fourni 29.35 g d'extrait éthéro-pétrolique brun clair, de consistance grasseuse.

Celui-ci est tout d'abord soumis à la saponification par 30 ml d'alcool méthylique additionnés de 30 ml de lessive de potasse à 6 %, dans un ballon muni d'un réfrigérant à reflux pendant 1 heure 30. L'extrait se colore en brun foncé. On distille au demi pour éliminer l'alcool et dilue le résidu avec 300 ml d'eau. Le liquide se trouble et devient brun roux.

On acidifie par l'acide chlorhydrique. La solution prend une teinte caramel et on voit se former un fin précipité en suspension, facilement soluble dans l'éther. Après plusieurs reprises, on obtient une solution éthérée brune, la solution aqueuse acide étant jaune pâle. La séparation des deux phases est longue car il se forme une émulsion. La phase aqueuse acide est mise de côté et sera désignée sous le nom de *Fraction acide n° 1*.

La phase éthérée est alors reprise dans une ampoule à décanter par la soude à 5 %, jusqu'à ce que les solutions sodiques soient incolores. Les solutions alcalines sont lavées à l'éther, réunies et mises de côté sous le nom de *Fraction alcaline n° 1*. Les solutions éthérées, rouge brun, réunies, sont concentrées, séchées sur sulfate de sodium anhydre et évaporées à sec. On obtient 10,80 g d'insaponifiable brun foncé, de consistance huileuse.

L'insaponifiable est ensuite soumis, selon la technique de BUTENANDT, à une distillation fractionnée sous une pression de 12 mm de mercure. Cet auteur élimine ainsi la fraction qui distille au-dessous de 200°. Avec la racine de Réglisse aucune substance ne passe avant 200°. La totalité de l'insaponifiable est donc hydrolysée dans les conditions suivantes : reprise par 40 ml d'alcool méthylique, la dissolution n'étant pas complète : on ajoute 20 ml d'acide chlorhydrique concentré et l'hydrolyse est effectuée au bain-marie bouillant pendant 1 heure 30. Le liquide est trouble et le résidu insolubilisé s'est aggloméré à la surface en gouttelettes noires. On dilue alors avec 60 ml d'eau et agite à plusieurs reprises avec de l'éther dans une ampoule à décanter. Les gouttes noires se dissolvent dans l'éther qui prend une teinte brune. La solution chlorhydrique d'hydrolyse est conservée et constitue la *Fraction acide n° 2*.

Les solutions éthérées sont ensuite lavées à NaOH 5 % assez rapidement, les solutions sodiques étant ensuite soigneusement lavées à l'éther. Ces solutions constituent la *Fraction alcaline n° 2*.

Quant aux liqueurs éthérées, elles sont agitées longuement avec NaOH 10 % qui extrait les substances phénoliques. Les liqueurs éthérées sont mises de côté sous le nom de *Solution éthérée n° 1*.

Les solutions alcalines (NaOH 10 %) jaunes sont acidifiées par l'acide chlorhydrique concentré. La solution devient vert pâle. Après trois reprises par l'éther qui se colore en jaune pâle, la liqueur acide est incolore.

Après évaporation de l'éther, on obtient 0.14 g de *fraction phénolique* (correspondant à la *solution éthérée n° 2*), de consistance solide, de teinte jaune foncé et d'odeur aromatique. Une seconde extraction, pratiquée sur 4 kg de drogue, a fourni 0.18 g de fraction phénolique, soit un rende-

ment moyen de 0,005 %. Avant de poursuivre la purification et de procéder à l'étude chromatographique, il nous a paru nécessaire de vérifier, sur les rates castrées, l'activité œstrogène de chacune des fractions.

La reprise des résidus des solutions éthérées n^{os} 1 et 2 par l'huile d'olive neutralisée n'a pas présenté de difficultés : 1 ml de solution huileuse correspond à 100 g de drogue. Aucune activité œstrogène de l'extrait éthéré n^o 1 n'a été constatée, mais l'extrait éthéré n^o 2 qui correspond à la fraction phénolique se révèle extrêmement actif, 0,5 ml provoquant autant d'œstrus que la solution étalon de folliculine à 10 U. I. par ml. C'est donc que 1 ml de cet extrait renferme 20 U. I.

Pour être injectables aux animaux, les solutions alcalines et acides sont d'abord neutralisées (virage au vert du bleu de bromothymol). Puis elles sont concentrées par distillation sous pression réduite et le résidu sec est repris par de l'acétone à reflux au bain-marie pendant 4 heures, les substances œstrogènes étant en général solubles dans ce solvant. Enfin, après élimination de l'acétone, le résidu est dissous dans l'huile d'olive neutralisée (1 ml de solution huileuse correspond toujours à 100 g de plante).

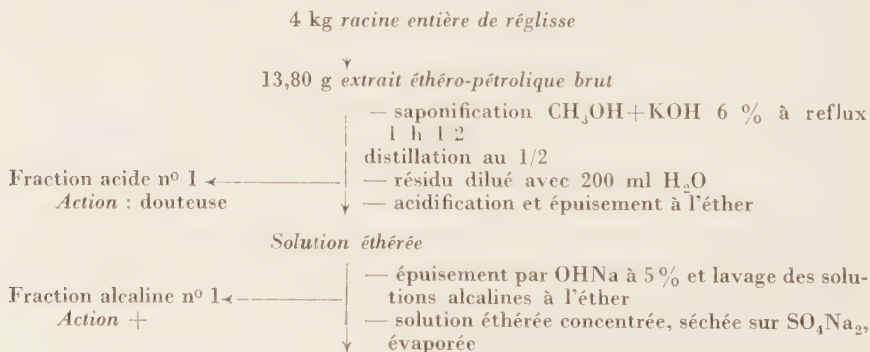
C'est ainsi que nous avons observé chez les rates injectées :

— pour la fraction acide n^o 1, une action douteuse car les frottis présentent à côté de cellules kératinisées très nettes, de nombreux leucocytes anormalement présents. Ou bien cette fraction possède une action desquamante propre, ou bien l'action œstrogène est insuffisante à la dose injectée ;

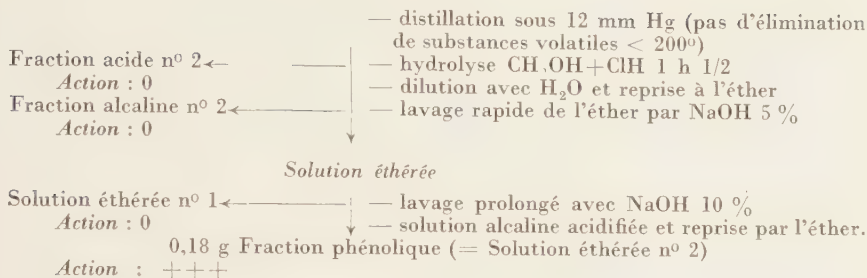
— pour la fraction alcaline n^o 1, une activité positive correspondant à 6,7 U. I. par ml ;

— pour les fractions acide n^o 2 et alcaline n^o 2, aucune activité.

Les opérations effectuées sont résumées dans le tableau suivant :



8 g 33 Huile insaponifiable



Il apparaît donc qu'une certaine partie des principes œstrogènes est éliminée après la saponification, au cours des lavages de la solution éthérée par NaOH à 5 %, mais qu'ensuite toute l'activité est concentrée dans la fraction phénolique. Une étude plus complète de cette fraction a donc été effectuée.

B. — Séparation par chromatographie sur papier

De nombreux auteurs ont décrit des méthodes de séparation et d'identification par chromatographie sur papier des trois hormones œstrogènes naturelles : œstriol, œstradiol et œstrone (ou folliculine). Toutes ces méthodes sont utilisées pour l'analyse des liquides biologiques. Nous en avons appliqué un certain nombre à l'étude de la fraction phénolique active obtenue précédemment, après avoir effectué une sélection des meilleurs systèmes de solvants et des révélateurs les plus sensibles, à l'aide de solutions-témoins des trois hormones pures *.

Œstrone et œstradiol furent utilisés en solution acétonique à 1 % ; l'œstriol en solution alcoolique de même concentration. Chaque spot correspondait à 5 mm³ de chacune des solutions, soit à 50 γ d'hormone œstrogène.

I. — Etude des solvants

Tous ces essais sont effectués sur papier Whatman n° 1, lavé ou non au préalable selon la technique employée. La plupart des méthodes utilisent la chromatographie ascendante, certaines exigent la chromatographie descendante.

* Nous adressons nos sincères remerciements au Dr SACKLER qui nous a aimablement envoyé ces échantillons.

1) CHROMATOGRAPHIE ASCENDANTE :

a) *Méthode d'Axelrod* (6) :

Les feuilles de papier, découpées aux dimensions requises, sont d'abord lavées à l'eau distillée, puis séchées à l'air ; lavées ensuite à l'alcool éthylique à 95° redistillé, et séchées de nouveau.

Quatre mélanges peuvent alors être réalisés :

- formamide-cyclohexène ;
- formamide-méthylcyclohexane ;
- formamide-*o*-dichlorobenzène ;
- formamide-chlorure de méthylène.

Tous les solvants doivent être purs et, s'il y a lieu, redistillés.

Un mélange à 50 % de formamide et d'alcool méthylique pur (P. E. = 66°) constitue la phase stable de chacun des mélanges. Les bandes de papier en sont imprégnées et sont ensuite essorées entre des feuilles de papier filtre, elles-mêmes préalablement lavées à l'eau distillée puis à l'alcool éthylique et séchées à l'air. Le séchage du papier imbibé de formamide à la température du laboratoire est très long. Il peut être accéléré en terminant à l'étuve à 60°.

Les taches sont faites et le chromatogramme est placé sous une cloche à chromatographie ascendante dans l'un des quatre solvants organiques indiqués ci-dessus, chacun d'eux constituant la phase mobile.

b) *Méthode d'Axelrod* (7) :

Le principe est identique à celui de la précédente méthode. Elle en diffère cependant par les lavages préalables du papier, et par de nouveaux mélanges de solvants.

Le papier est lavé trois fois : dans l'acide acétique environ 2 N ; dans l'eau distillée ; dans l'alcool méthylique redistillé. Après chaque lavage, il est séché à l'air.

Deux mélanges utilisent le formamide comme phase stable :

- formamide-cyclohexène pur ;
- formamide-décaline (= décahydro-naphtalène) redistillée.

Les bandes sont imprégnées d'une solution à 50 % de formamide et d'alcool méthylique, puis séchées entre des feuilles de papier filtre, elles-mêmes lavées et séchées, leur dessiccation complète s'achevant à l'étuve à 60°. Après avoir déposé les spots, les chromatogrammes sont placés, sous une cloche à chromatographie ascendante, dans un récipient contenant la phase mobile (cyclohexène ou décaline).

Un troisième mélange comporte le propylène-glycol comme phase stable et le méthylcyclohexane comme phase mobile.

Enfin, le quatrième comprend, comme phase stable, un mélange à 50 % de propylène-glycol et d'alcool méthylique redistillé, et, comme phase mobile, le méthylcyclohexane.

c) *Méthode d'Eberlein* (44) :

Technique classique de la chromatographie ascendante, plusieurs systèmes de solvants sont proposés.

Toutefois, nous n'avons pas pu réaliser l'une des conditions indiquées par l'auteur : la cuve chromatographique aurait dû être enveloppée d'une jaquette électrique et équilibrée à une température maximum de 32°. Nos chromatogrammes furent développés à la température ambiante de 20°, et séchés ensuite à la même température.

Nous avons essayé les systèmes suivants :

- 1) benzène : 50 ml. alcool méthylique : 25 ml, eau distillée : 25 ml ;
- 2) hexane : 50 ml. butanol tertiaire : 22.5 ml, alcool méthylique : 22,5 ml, eau : 20 ml ;
- 3) isooctane * (2.2.4 triméthylpentane) : 25 ml. toluène : 25 ml, alcool méthylique : 35 ml, eau : 15 ml ;
- 4) isooctane : 50 ml, butanol tertiaire : 25 ml, eau : 45 ml.

2) CHROMATOGRAPHIE DESCENDANTE :

Méthode de Heusghem (67) :

Le lavage préalable du papier n'est pas nécessaire. L'atmosphère de la cuve, ainsi que la bande de papier sur laquelle les taches ont été déposées, sont d'abord saturées par les vapeurs d'une solution ammoniacale $N/2$ disposée dans un récipient au fond de la cuve (1 à 2 heures).

Pendant ce temps, le mélange suivant est préparé dans une ampoule à décanner :

{	Chloroforme pur	1 volume
{	Benzène pur	9 volumes
{	Ammoniaque N	1 volume

La phase mobile, phase organique de ce système, est introduite dans la cuve, sans désaturation de l'atmosphère de celle-ci. Le développement du chromatogramme s'effectue à la température ambiante. Lorsque le parcours accompli est suffisant, on sèche à l'air et révèle.

* Nous remercions vivement Monsieur le Professeur LYS pour nous avoir procuré ce solvant.

II. — Etude des révélateurs

Avant d'être soumis aux révélateurs chimiques, les chromatogrammes sont toujours examinés en lumière ultra-violette.

1) *Chlorure ferrique* :

En solution à 2 % dans l'alcool méthylique pur. Après avoir été plongée dans ce réactif, la bande de papier est séchée à l'étuve à 100°.

2) *Pentachlorure d'antimoine* :

Un volume, pour 2 volumes de chloroforme pur. Après immersion, les bandes sont mises à sécher sous une hotte.

3) *Réactif au chlorure de benzoyle* :

— 5 volumes de solution de Cl_2Zn à 40 % dans l'acide acétique glacial ;

— 7 volumes de chlorure de benzoyle ;

— 7 volumes de chloroforme.

Conserver dans un flacon en verre coloré et bouchant à l'émeri. Ce réactif est stable pendant trois mois environ. Il est assez difficile à préparer et à manipuler. Le chromatogramme qui en est imbibé est porté quelques instants à l'étuve à 100°.

Ces trois réactifs sont indiqués par AXELROD (6). Nous avons également essayé les révélateurs suivants employés par le même auteur dans une seconde publication (7).

4) *Chlorure de triphényltétrazolium* :

En solution aqueuse à 0,2 %. Avant d'être séché à l'air, le chromatogramme est lavé à l'eau.

5) *m-Dinitrobenzène* :

— 2 volumes de solution de *m*-dinitrobenzène à 1 % dans l'alcool méthylique ;

— 1 volume de potasse aqueuse à 15 % mélangé extemporanément. La bande de papier imbibée de ce révélateur est portée à l'étude à 100° jusqu'à développement de la coloration.

6) *2.4. dinitrophénylhydrazine* :

Dissoudre 0,15 g de ce réactif dans 25 ml d'eau et 22 ml d'acide chlorhydrique concentré. Ajuster ensuite à 100 ml à l'aide d'eau distillée.

Après immersion, la bande de papier est maintenue à l'air 2 minutes avant d'être séchée à l'étuve.

BURTON et collaborateurs (21) utilisent encore d'autres révélateurs :

7) *Nitrate d'argent alcalin* :

10 ml de nitrate d'argent 0.1 N sont additionnés de X gouttes d'ammoniaque concentrée et de 5 ml de solution de lessive de soude à 10 % au moment de l'emploi.

Après avoir été plongé dans ce réactif, le chromatogramme est lavé dans une solution aqueuse d'hyposulfite de sodium à 5 %, rincé à l'eau distillée puis séché à l'air.

8) *Réactif iodé* :

Solution aqueuse d'iode à 0.3 % solubilisé par 5 % d'iodure de potassium.

Aussitôt après immersion, la bande est soigneusement lavée à l'eau distillée afin de décolorer le fond du chromatogramme.

9) *Permanganate de potassium* :

Solution aqueuse à 0.2 % renfermant 5 % de carbonate disodique.

Comme précédemment la bande est lavée à l'eau distillée à plusieurs reprises afin d'obtenir un fond de chromatogramme incolore.

Nous avons encore essayé un réactif proposé par HEUSCHEM (67) et qui donne des couleurs différentes avec les stéroïdes hormonaux : brun avec l'œstrone, jaune avec l'œstradiol et rose avec l'œstriol :

10) *Trichlorure d'antimoine* :

en solution chloroformique à 10 %.

La bande de papier, immergée dans ce révélateur est chauffée pendant 5 minutes à 90-100°, afin que les colorations (rose : œstriol ; jaune : œstradiol ; brun : œstrone) se développent complètement. On examine ensuite en lumière ultra-violette.

Enfin, nous avons essayé un dernier réactif préconisé par JELLINEK (75) :

11) *Chlorure ferrique et ferricyanure de potassium* :

Deux solutions aqueuses à 1 % sont préparées et mélangées, à parties égales, immédiatement avant l'emploi.

Bien qu'il ne soit pas signalé par cet auteur de décolorer le fond du chromatogramme par lavages à l'eau afin d'éliminer l'excès de réactif, il nous a paru bon de le faire, les taches se détachant alors beaucoup mieux après séchage à l'air.

CONCLUSION

Ces essais préliminaires avec les solutions-témoins ont permis d'éliminer quelques mélanges ayant donné une mauvaise séparation et de sélectionner les autres, ainsi que les révélateurs les plus sensibles.

En chromatographie ascendante, nous avons retenu les solvants suivants :

- cyclohexène-formamide ;
- méthylcyclohexane-formamide ;
- *o*-dichlorobenzène-formamide
selon AXELROD (6).
- cyclohexène-formamide,
selon AXELROD (7).
- isooctane-toluène ;
- isooctane-butanol tertiaire,
selon EBERLEIN (44).

et en chromatographie descendante, la méthode décrite par HEUSCHEM (67).

Les révélateurs suivants seront appliqués à chaque chromatogramme, après examen en lumière ultra-violette :

- trichlorure d'antimoine ;
- pentachlorure d'antimoine ;
- *m.* dinitro-benzène ;
- permanganate de potassium ;
- chlorure ferrique et ferricyanure de potassium.

III. Chromatographie comparative en présence de témoins

Par les méthodes décrites et sélectionnées ci-dessus, nous avons comparé les spots obtenus avec la fraction phénolique extraite de la racine de Réglisse selon la méthode de BUTENANDT exposée plus haut, et les spots fournis par les hormones pures.

Des solutions acétoniques à 1 % d'œstradiol et d'œstrone et une solution alcoolique à 1 % d'œstriol furent préparées.

Quant à la fraction phénolique (que nous désignerons pour plus de commodité par l'initiale R.), elle est mise en solution étherée à 10 %.

Chaque spot déposé sur les chromatogrammes correspond à 5 mm³ de ces solutions.

Afin de rendre les résultats plus clairs nous les avons groupés en tableaux.

1) Système cyclohexène-formamide n° 1 :

Selon AXELROD (6).

Température : 24 ° ;

Temps de montée : 4 heures.

Révélateurs :	Cl ₃ Sb	Cl ₅ Sb	<i>m</i> -dinitro- benzène	MnO ₄ K	Cl ₃ Fe- Ferrieyanure K
Œstriol	Trainée rose Rf : 0,22	0	0	Trainée brune Rf : 0,22	Trainée bleu foncé Rf : 0,22
Œstradiol . . .	Tache allongée jaune Rf : 0,91	Rosâtre Rf : 0,91	0	Brun Rf : 0,92	Bleu foncé Rf : 0,91
Œstrone	Tache violacée Rf : 0,92	Rosâtre Rf : 0,92	Violacé Rf : 0,92	Brun Rf : 0,92	Bleu foncé Rf : 0,92
R.	Tache arrondie jaune foncé Rf : 0,95	Rose vif Rf : 0,95	Jaune même Rf.	Brun même Rf.	Bleu vert même Rf.

Ce système sépare mal l'œstrone et l'œstradiol qui ont pratiquement le même Rf. L'œstriol donne une trainée et non une tache nette. Enfin la fraction R. migre à la manière de l'œstrone et de l'œstradiol sans qu'il soit possible de conclure à la présence de l'une ou l'autre des deux hormones, ou des deux.

2) Système méthylcyclohexane-formamide :

Selon AXELROD (6).

Température : 24° ;

Temps de montée : 2 heures 45.

Révélateurs :	Cl ₃ Sb	Cl ₅ Sb	<i>m</i> -dinitro- benzène	MnO ₄ K	Cl ₃ Fe- Ferrieyanure K
Œstriol	Tache rose au point de dé- part	Brun foncé	0	Brun	Bleu foncé
Œstradiol . . .	Tache jaune au point de départ	Brun	Jaune pâle	Brun	Bleu foncé
Œstrone	Tache brunclair, n'a pas migré	Brun foncé	Violet	Brun	Bleu foncé
R.	Tache brune au point de dé- part Courte trainée rose Rf : 0,04 Longue trainée jaune Rf : 0,36	Point de départ brun foncé Longue trainée jaunâtre	Point de départ jaune foncé Longue trainée jaune	Point de départ brun	Point de départ bleu foncé Toute la trainée est bleu clair

Ce système ne peut permettre, semble-t-il, aucune conclusion, les témoins n'étant pas entraînés. Seule une partie de la fraction R., qu'il n'est pas possible d'identifier, migre un peu.

3) *Système o-dichlorobenzène-formamide* :

Selon AXELROD (6).

Température : 22° ;

Temps de montée : 2 heures 20.

Révélateurs :	Cl_3Sb	Cl_3Sb	<i>m</i> -dinitro- benzène	MnO_4K	Cl_3Fe - Ferriyanure K
Œstriol	Tache rose au point de départ	Brun	0	Brun	Bleu foncé
Œstradiol . .	Tache jaune au point de départ	Tache très allongée, brun rosé Rf : 0,60	0	Tache jaune foncé Rf : 0,60	Tache bleu foncé au point de départ Tache très allongée bleu plus clair Rf : 0,60
Œstrone	0	Tache brune au point de départ 2 ^e tache allongée brune Rf : 0,83	0	Tache jaune au point de départ	2 taches bleues : point de départ Rf : 0,83
R.	Tache jaune orangé au point de départ suivie d'une légèr trainée Tache ovale rose Rf : 0,65 Tache arrondie brune Rf : 0,87	Tache rouge au point de départ suivie d'une trainée beige rosé Tache brun rouge Rf : 0,87	Tache jaune Rf : 0,87	Taches brun clair Rf : 0,65 et 0,87	Bleu foncé Point de départ Tache allongée Rf : 0,52 Tache arrondie Rf : 0,87

Par cette méthode, l'œstriol ne migre pas. Œstrone et œstradiol sont entraînés en partie. La fraction R. donne une tache de Rf 0,65 se rapprochant de l'œstradiol (Rf 0,60) et une autre tache de Rf 0,87 proche de celle de l'œstrone (Rf 0,83).

4) *Système cyclohexène-formamide n° 2* :

Selon AXELROD (7).

Température : 22° ;

Temps de montée : 2 heures 45.

Révélateurs :	Cl ₃ Sb	Cl ₅ Sb	<i>m</i> -dinitro- benzène	MnO ₄ K	Cl ₃ Fe- Ferri cyanure K
œstriol	0	Tache rose Rf : 0,34	0	0	Tache bleue Rf : 0,34
œstradiol ..	0	Tache arrondie brun rosé Rf : 0,92	0	Tache brune Rf : 0,92	Tache bleu fon- cé Rf : 0,92
œstrone	0	Tache arrondie brune Rf : 0,92	0	Tache brune Rf : 0,92	Tache bleu fon- cé Rf : 0,92
R	Tache ronde brun foncé Rf : 0,95	Tache brun fon- cé Rf : 0,95 entourée d'un halo rose vif	Tache jaune Rf : 0,95	Tache brune Rf : 0,95	Tache bleu fon- cé Rf : 0,95

Au cours de cet essai, les trois témoins ont migré en taches bien définies. Cependant œstrone et œstradiol possèdent des Rf identiques et celui de la fraction R. en est très voisin.

5) Système isooctane-toluène :

Selon EBERLEIN (44).

Système	isooctane pur (ou 2, 2' 4, triméthyl-pentane) .	250 ml
	toluène pur	250 ml
	alcool méthylique redistillé	350 ml
	eau distillée	150 ml

Température : 21° ;

Temps de montée : 2 heures 45.

Révélateurs :	Cl ₃ Sb	<i>m</i> -dinitrobenzène	Cl ₃ Fe-Ferri cyanure K
œstriol . . .	Tache rose n'a pas migré	0	Tache bleue au point de départ
œstradiol .	Trainée violacée peu visible	0	Trainée bleue, allongée à partir du point de départ. Rf : 0,39
œstrone ..	0	Traces violacées vers le point de départ	Longue trainée bleue tout le long de la feuille
R	Tache brun clair au point de départ Tache rose vif Rf : 0,79 Tache brune Rf : 0,97	Tache jaune Rf : 0,97	Trainée bleue assez comparable à celle de l'œstradiol Tache bleue Rf : 0,97

L'œstriol n'est pas entraîné par ce système. Œstradiol et œstrone migrent sous forme de traînées, celle de l'œstrone étant beaucoup plus étirée. La fraction R., révélée au chlorure ferrique-ferri cyanure, présente une traînée assez comparable à celle de l'œstradiol mais après révélation au trichlorure d'antimoine on obtient une tache rose de Rf net, contrairement à ce qui se produit pour l'hormone témoin.

En outre, la fraction R. présente avec tous les révélateurs une tache nette de Rf 0.97, atteignant presque le front du solvant (l'œstrone donne au même niveau une traînée étirée).

6) *Système isooctane-butanol tertiaire :*

Selon EBERLEIN (44).

Système	isooctane pur	500 ml
	butanol tertiaire	250 ml
	eau distillée	450 ml

Température : 20° ;

Temps de montée : 5 heures.

Révélateurs :	Cl ₃ Sb	m-dinitrobenzène	Cl ₃ Fe-Ferri cyanure K
Œstriol . . .	Tache rose Rf : 0,44	0	Tache allongée bleue Rf : 0,44
Œstradiol . .	Tache allongée triangulaire jaunâtre Rf : 0,91	Tache brune Rf : 0,91	Tache triangulaire, étirée, bleu foncé Rf : 0,91
Œstrone . . .	Tache triangulaire, longue, brune Rf : 0,92	0	Tache de même forme, bleu foncé Rf : 0,91
R	Tache brun clair au point de départ Tache brune Rf : 0,97	Tache ovale jaune Rf : 0,97	Tache ovale, bleu foncé Rf : 0,97

Ce système sépare bien l'œstriol, mais œstradiol et œstrone ont le même Rf et les spots sont mal formés. La fraction phénolique de la Régliste présente un spot comparable à ceux de ces deux témoins.

7) *Système de Heusghem (67) :*

Température : 22° ;

Temps de descente : 6 heures.

Révélateurs :	Cl_3Sb	Cl_5Sb	<i>m</i> -dinitro- benzène	Cl_3Fe -Ferrieyanure K
Œstriol ...	Tache rose, a très peu migré Rf : 0,02	Brun foncé Rf : 0,02	0	Tache bleu foncé Rf : 0,02
Œstradiol .	Tache jaune peu nette	Tache brun clair, ovale Rf : 0,86	0	Tache bleu foncé Rf : 0,86
Œstrone ..	0	Tache brun clair, ronde Rf : 0,91	0	Tache bleu foncé Rf : 0,91
R	Tache jaune au point de dé- part Tache ovale rose Rf : 0,78 Tache ronde brun rosé Rf : 0,92	Point de départ brun foncé Tache brun clair Rf : 0,92	Tache jaune Rf : 0,92	Point de départ jaune- vert, suivie d'une lé- gère trainée. Tache bleue Rf : 0,92

L'œstriol est peu entraîné par ce système qui, à la différence de la plupart des solvants, permet une différenciation nette de l'œstradiol et de l'œstrone. La fraction R. présente une tache Rf 0,92 vraiment comparable au Rf 0,91 de l'œstrone. Mais par Cl_3Sb apparaît une deuxième tache très nette, rose vif. Rf 0,78 (0,86 pour l'œstradiol). Rappelons que HEUSCHEM donne comme Rf de référence : 0,02 pour l'œstriol, 0,78 pour l'œstradiol et 0,89 pour l'œstrone.

CONCLUSION

En résumé 2 spots ont été obtenus avec la fraction physiologiquement active : l'un est de Rf 0,92 dans les conditions décrites, donc très identique à celui de l'œstrone pur (ou folliculine). L'autre de Rf 0,78 assez proche de celui de l'œstradiol (Rf 0,86). Cependant les colorations des spots sont assez différentes de celles des témoins purs et il ne nous est pas possible de conclure avec certitude.

En tous cas, il ne peut s'agir d'œstriol comme le pensaient COSTELLO et LYNN (35) d'après l'examen du seul spectre d'absorption.

CHAPITRE V

ÉTUDE PHYSIOLOGIQUE

La Réglisse n'est plus considérée de nos jours comme un simple édulcorant ou adjuvant banal des formules pharmaceutiques. Depuis les travaux de ces dernières années, elle est employée comme une drogue anti-ulcère gastrique. Or, jusqu'alors, c'est seulement sur la glycyrrhizine, constituant sucré de la « racine douce », qu'avaient été pratiqués la plupart des essais physiologiques. Aucun autre constituant défini n'avait été soumis aux différents essais. La glycyrrhizine ne possède pas les propriétés des extraits totaux ou déglycyrrhizinés de la plante, qui sont antispasmodiques. Après avoir isolé les dérivés flavoniques de cette drogue, nous avons effectué leur étude physiologique ; mais étant données les difficultés de séparation du liquiritoside (flavanone) et de l'iso-liquiritoside (chalcone), cette étude n'a pu être faite que sur un mélange de ces substances renfermant approximativement 40 % de flavanone et 60 % de chalcone. En effet, si le fractionnement sur colonne de cellulose nous a permis d'en effectuer l'étude chimique, à notre grand regret, le rendement fut insuffisant pour permettre une étude pharmacodynamique séparée de chacune de ces deux formes.

A. — Dérivés flavoniques

I. — Détermination de la toxicité aiguë et chronique

Les essais de toxicité aiguë et de toxicité chronique ont été pratiqués chez la souris blanche adulte.

1) Toxicité aiguë :

Un premier essai, sur un lot de 10 souris de poids moyen de 19 g, fut effectué sur une solution aqueuse à 5 %. Chaque souris reçoit, par voie sous-cutanée, 1 ml de solution soit 0,05 g de produit. Au bout de

4 jours d'observation, il n'y a eu aucun phénomène apparent d'intoxication.

Un deuxième essai est pratiqué sur un autre lot de 10 animaux qui reçoivent, toujours par voie sous-cutanée, chacun 1 ml de solution aqueuse à 10⁰/₀ soit 0.10 g de produit. Au bout de 4 jours aucun phénomène d'intoxication ne s'est manifesté.

2) Toxicité chronique :

10 souris ont reçu quotidiennement pendant 30 jours par ingestion forcée 0.5 ml de solution aqueuse à 2⁰/₀, soit 0.01 g de substance (0,50 g/kg). par jour et par animal. Le poids moyen des animaux reste de 19 g et aucune mortalité n'a été constatée.

Les dérivés flavoniques de la racine de Réglisse se montrent donc inoffensifs chez la souris : la dose unique de 5 g/kg d'animal a pu être atteinte sans incident. D'ailleurs, pour la plupart des dérivés flavoniques, la toxicité est extrêmement faible, comme l'ont remarqué PARIS et VAIREL (103) dans leur étude pharmacodynamique de ces dérivés.

Cette innocuité des flavonosides est à opposer à une certaine toxicité présentée par le suc de Réglisse total, du fait de la présence de glycyrrhizine qui appartient, rappelons-le, au groupe des saponosides.

II. — Activité antispasmodique sur l'intestin isolé

Nous avons utilisé la technique classique dite de MAGNUS. Une portion d'iléon est prélevée sur un lapin récemment tué par saignée. Un morceau de 1 cm de long environ est fixé dans un tube laboratoire rempli de solution de Tyrode (25 ml) à 40° et aéré de façon permanente. Les contractions, transmises par un myographe de Jeanne LÉVY, sont enregistrées sur un cylindre noirci, suivant le procédé habituel.

Après avoir attendu que les mouvements pendulaires aient pris un rythme régulier, nous avons ajouté une certaine quantité de dérivés flavoniques. Les modifications apportées ont été enregistrées. Il a été procédé à plusieurs lavages entre chaque essai. Une nouvelle expérience n'a été tentée qu'après retour à l'amplitude et à la fréquence initiales des mouvements pendulaires.

1) Action sur les contractions normales :

L'addition de 0,1 ml d'une solution aqueuse de liquiritoside à 1% (concentration dans la cuve de 1/25.000) n'amène aucune modification.

Avec 0,5 ml de la même solution (concentration dans la cuve de

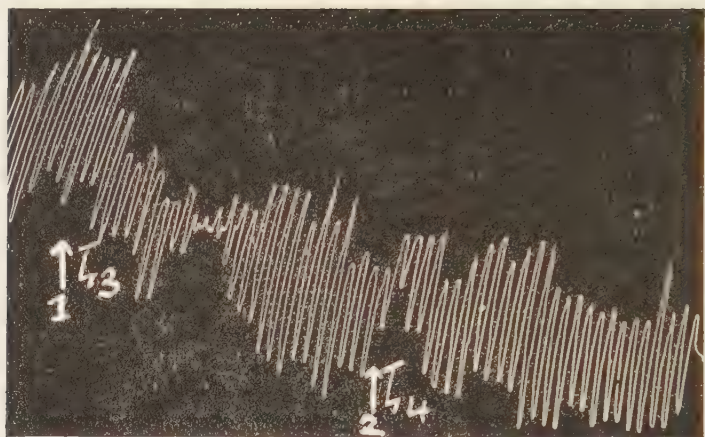


FIGURE 13.— Action des dérivés flavoniques de la Réglisse sur l'intestin isolé de lapin : action de faibles doses (en 1 et 2, addition de 5 mg de flavonoïdes).



FIGURE 14. — Action des dérivés flavoniques de la Réglisse sur l'intestin isolé de lapin : action de fortes doses (addition de 10 mg de flavonoïdes).

1/5.000), en provoque une légère diminution du tonus et de l'amplitude des mouvements pendulaires (Figure 13).

Avec 1 ml de la même solution (10 mg de substance ; concentration dans la cuve de 1 2.500), on enregistre une chute complète du tonus et de l'amplitude des contractions normales de l'intestin isolé de lapin (Figure 14), déjà signalée par BUSQUET et NELEMANS-STAMPERIUS pour le suc.

2) Action sur les contractions provoquées :

1) *Acétylcholine* : 0,25 ml d'une solution d'acétylcholine à 2 ‰ (500 γ) ont été introduits dans la cuve d'expérimentation. Les contractions spontanées du fragment d'intestin isolé de lapin ont subi une brusque augmentation. Leur tonus et leur amplitude ont été inhibés par l'addition de 1ml de la solution flavonique à 1 ‰ (soit 10 mg).

2) *Histamine* : au bain de Tyrode, 1 ml de solution histaminique à 1 ‰, soit 1 mg d'histamine, a été d'abord ajouté, provoquant un spasme de l'intestin : 1 ml de solution flavonique à 1 ‰ (10 mg) étant alors introduit, il a été constaté une diminution progressive de l'amplitude des contractions. (Figure 15).



FIGURE 15. — Action des dérivés flavoniques de la Réglisse sur l'intestin isolé de lapin en présence d'histamine :

en 1 : addition d'histamine (dilution 1.10^{-5}) ;

en 2 : addition des flavonoïdes (dilution 1/2.500).

3) *Chlorure de baryum* : nous avons pu constater que les spasmes de l'intestin isolé de lapin dus à 1 ml de solution de chlorure de baryum à 2 ‰ (soit 2 mg de chlorure de baryum) sont supprimés totalement par l'addition consécutive de 10 mg de dérivés flavoniques, l'amplitude des contractions redevenant ensuite peu à peu normale.

De ces expérimentations, il ressort que les flavonoïdes de la Réglisse (liquiritoside-flavanone et liquiritoside-chalcone) sont bien doués de propriétés antispasmodiques susceptibles d'intervenir dans l'action antiulcéreuse des sucs de Réglisse. Ce totum flavonique utilisé était exempt de glycyrrhizine (réaction de BRIESKORN et BRINER négative) (voir p. 89).

Nous avons en outre remarqué que la glycyrrhizine commerciale qui se présente sous forme de paillettes noirâtres donnait une réaction de la cyanidine nettement positive — ce qui est en accord avec le fait, reconnu par VINCENT, que cette substance est douée de propriétés antispasmodiques.

III. — Action sur les ulcères expérimentaux

Il existe plusieurs techniques de création d'ulcères gastriques expérimentaux chez l'animal, dont les plus récentes sont les suivantes :

— l'ulcère histaminique obtenu chez le cobaye par injection de doses déterminées d'histamine, l'animal étant préalablement protégé contre les accidents dyspnéiques par injection d'une substance anti-histaminique : technique de PASTEUR-VALLÉRY-RADOT, HALPERN et MARTIN (108) ;

— l'ulcère cinchophénique obtenu chez le chien après injections répétées de cinchophène (acide phénylquinoléine-carbonique) ;

— l'ulcère obtenu chez le rat par ligature du pylore suivant la technique de SHAY (127).

Pour tenter d'élucider la genèse de l'ulcère gastro-duodéal de l'homme lui-même, plusieurs théories pathogéniques s'affrontent : les lésions expérimentales obtenues par l'histamine ou la technique de SHAY s'en éloignent sans aucun doute. Dans l'un et l'autre cas, l'animal est traumatisé. Seul, l'ulcère cinchophénique reproduit chez l'animal des lésions ulcéreuses chroniques plus proches des ulcères humains.

Nous avons rappelé précédemment les différents travaux effectués à ce point de vue sur la Réglisse, et réalisés à partir d'extraits de la drogue (voir p. 27).

Nous avons eu la possibilité d'expérimenter le totum flavonique chez le rat préparé selon la technique de SHAY *.

L'expérimentation a été réalisée sur un lot parfaitement homogène de rats dont le poids moyen était de 110 g.

1) TECHNIQUE :

Les animaux ont été soumis pendant 48 heures à un jeûne hydrique.

La boisson a été retirée à la fin de cette période de 48 heures. L'intervention a été pratiquée 4 heures après le début du jeûne total, sous anesthésie à l'éther.

Après incision de la paroi abdominale et du péritoine sur la ligne médiane, la région pylorique a été découverte et extériorisée, puis le caual pylorique a été ligaturé à l'aide d'un catgut n° 9. Après réintégration du pyllore dans la cavité abdominale, l'incision pariétale a été fermée à l'aide de trois fils de lin, puis recouverte d'une couche de collodion destinée à assurer une parfaite obturation pariétale. Les animaux ont alors été placés sous oxygène pendant 30 secondes, puis isolés. Tous les animaux, sauf 2, survivaient 22 heures plus tard, moment auquel ils ont été sacrifiés par décapitation.

L'autopsie a été pratiquée aussitôt après la décapitation. Après appréciation de l'importance de la dilatation gastrique, une ligature a été placée sur le bas œsophage, l'estomac étant retiré après section de l'œsophage au-dessus de cette ligature et section du duodénum au-dessous de la ligature pylorique. Le contenu gastrique ayant été prélevé par ponction, l'estomac a été ouvert le long de la grande courbure et l'état de la muqueuse a été examiné après étalement de l'estomac et lavage sous un mince filet d'eau.

L'expérimentation a été réalisée sur 2 séries d'animaux de 24 rats chacune. L'une, servant de témoin, a subi seulement la ligature du pyllore dans les conditions décrites. Les animaux de l'autre série ont reçu de plus deux injections de 2 ml chacune d'une solution aqueuse à 10% de substances flavoniques (10 cg au total). La tolérance à ces injections a paru excellente, aucun trouble de l'état général n'ayant été observé à leur suite.

2) RÉSULTATS :

1) *Fréquence des lésions :*

On observe que 16,6% seulement des animaux de la série témoin ont une muqueuse gastrique macroscopiquement saine, tandis que cette

* Nous remercions Monsieur le Professeur NORDMANN pour son aide au cours de cette expérimentation.

même proportion est de 54,2 % dans la série d'animaux traités par les flavones de la Réglisse.

2) *Gravité des lésions :*

L'importance des lésions chez les animaux ayant une atteinte muqueuse est elle-même différente dans les 2 groupes.

On constate que, même chez les animaux non protégés totalement par les injections de dérivés flavoniques, les lésions sont moins sévères que chez les animaux témoins. De façon à obtenir une appréciation numérique, quoique arbitraire, de cette différence, nous avons multiplié la proportion d'animaux de chaque groupe par le degré des lésions (+ 1 à + 4) ; on obtient dans ces conditions un degré moyen des lésions de + 2,72 pour la série témoin, + 1,82 pour la série ayant reçu le produit.

CONCLUSION

Ces chiffres mettent donc en évidence l'action protectrice, contre les ulcères gastriques expérimentaux, exercée par les dérivés flavoniques de la racine de Réglisse. La fréquence et la gravité des lésions ont été réduites de façon significative.

Signalons qu'une action protectrice contre les ulcères gastriques vient d'être mise en évidence par R. PARIS pour d'autres flavonoïdes : rutoside et quercétol (107).

IV. — Action sur la perméabilité et la résistance capillaire

On sait maintenant que de nombreuses flavones, en même temps qu'elles diminuent la perméabilité des capillaires, en augmentent la résistance. Ces deux actions concomitantes sont groupées sous le nom de « propriétés vitaminiques P » et il apparut rationnel de vérifier l'une et l'autre de ces activités avec les dérivés flavoniques de la racine de Réglisse.

A. — ACTION SUR LA PERMÉABILITÉ CAPILLAIRE :

Pour cette détermination, nous avons adopté la technique décrite par PARIS et VAIREL (103), voisine de celle de AMBROSE et DE EDS (4) ; elle est basée sur la diffusion d'une solution de bleu trypan à travers les capillaires de l'animal.

1) *Emploi du test chez le lapin :*

Des lapins de 2 à 3 kg sont épilés sur le ventre à l'aide d'une solution de monosulfure de sodium, 48 heures avant l'expérience. La région épilée est divisée en 2 rangées de 5 à 6 carrés de 3 cm de côté par des traits de crayon dermatographique. On injecte dans la veine marginale de l'oreille du lapin 1 ml par kg d'une solution de bleu trypan à 1 % fraîchement préparée et filtrée avant l'injection : 20 minutes après on applique pendant 30 secondes, sur l'un des carrés délimités, un petit tampon de coton de 2 cm de côté, imbibé de 0.5 ml de chloroforme. On note le temps qui s'écoule entre la fin de l'attouchement au chloroforme et l'apparition de la coloration dans la zone irritée. L'expérience est répétée sur les autres carrés.

Lorsqu'un lapin reçoit une injection intra-veineuse de bleu trypan, ce colorant apparaît sous la peau environ une dizaine d'heures après l'administration. La peau est alors entièrement teinte en bleu d'une manière uniforme et il est impossible de se servir de l'animal. Cette coloration bleue peut mettre 15 jours et même 1 mois à disparaître.

Or, ainsi que PARIS et VAIREL l'ont remarqué, l'action d'une substance d'action vitaminique P. administrée par voie sous-cutanée, met plusieurs heures pour se manifester d'une manière suffisamment intense pour être décelée par le test. Aussi l'injection sous-cutanée des liquiritosides (5 ml par kilo d'animal d'une solution à 0,20 %, soit 10 mg de substance par kilo d'animal) a-t-elle été pratiquée 5 heures avant l'injection intraveineuse de bleu trypan : 20 minutes après l'injection du colorant, on détermine le temps d'apparition de la coloration bleue après attouchement au chloroforme. Le temps moyen donnant la perméabilité capillaire est comparé au temps moyen obtenu chez des animaux témoins auxquels on a injecté 10 mg par kg de rutoside solubilisé par le propylène-glycol.

2) *Résultats :*

Animaux témoins (traités au rutoside) :

- Lapin n° 1 : temps initial ... 3'40
 temps 5 heures après injection ... 5'25
- Lapin n° 2 : temps initial ... 3'02
 temps 5 heures après injection ... 7'13

Animaux traités par les liquiritosides :

- Lapin n° 1 : temps initial ... 2'08
 temps 5 heures après injection ... 4'40

— Lapin n° 2 : temps initial ... 2'06
 temps 5 heures après injection ... 7'41

3) Conclusion :

Les dérivés flavoniques de la racine de Réglisse semblent donc bien diminuer la perméabilité des capillaires.

B. — ACTION SUR LA RÉSISTANCE CAPILLAIRE :

1) Technique :

Pour l'évaluation de la résistance capillaire, de nombreuses techniques ont été préconisées : elles consistent à déterminer le temps d'apparition et le nombre de taches purpuriques ou pétéchiés, provenant de la rupture de la paroi capillaire et de la sortie des hématies, apparaissant sous l'influence d'une différence de pression. On peut procéder soit par compression à l'aide d'un brassard, soit par dépression au moyen d'une ventouse.

Ce dernier procédé a été remanié et adopté par PARIS et VAIREL (103). Deux facteurs intervenant, le temps et la pression, on maintient constant l'un des deux, tandis que l'autre varie. En procédant à dépression constante, on détermine le temps minimum d'apparition des premières pétéchiés au niveau de la région lombaire de l'animal, de chaque côté de la colonne vertébrale. L'animal utilisé pour ces essais est le cobaye. La substance est administrée par voie sous-cutanée.

2) Résultats :

Chaque animal a reçu 5 mg par kg de dérivés flavoniques. Les résultats sont les suivants :

Cobaye n° 1 :

	Avant		48 h. après l'injection		6 jours après	
Pression	27 cm		27 cm		27 cm	
Temps d'apparition des pétéchiés	3'25 (haut) *	5'15 (bas)	6'42 (haut)	9'42 (bas)	10' (haut)	9' (bas)

Cobaye n° 2 :

	Avant		48 h. après l'injection		6 jours après	
Pression	27 cm		27 cm		27 cm	
Temps d'apparition des pétéchiés	1'55 (haut)	4'10 (bas)	5'25 (haut)	8'35 (bas)	6'25 (haut)	7' (bas)

* Opération effectuée dans le haut et le bas de la région lombaire.

Un essai effectué avec la rutine à la dose de 5 mg par kg d'animal a donné les résultats suivants :

Cobaye n° 3 :

	Avant	48 h. après l'injection	6 jours après	
Pression	27 cm	27 cm	27 cm	
Temps d'apparition des pétéchiies	1'44	2'33	18' (haut)	4'15 (bas)

Cobaye n° 4 :

	Avant	48 h. après l'injection	6 jours après	
Pression	27 cm	27 cm	27 cm	
Temps d'apparition des pétéchiies	2'	2'20	13' (haut)	4' (bas)

3) Conclusion :

Les dérivés flavoniques de la Réglisse, non seulement diminuent la perméabilité des capillaires, mais ils en augmentent la résistance. Ils se rapprochent donc de substances qui, comme le rutoside, sont douées de propriétés vitaminiques P.

V. — Action sur la pression artérielle

Le mélange des flavonoïdes de la Réglisse, a été administré à des rats rendus hypertendus par la méthode d'ischémie rénale. La mesure de la tension artérielle fut faite à l'aide de l'oscillomètre enregistreur de GIONO, CHEVILLARD et KRAUTHAMER (33, 54, 79) *.

1) Technique :

Des rats très jeunes, pesant moins de 80 g sont anesthésiés à l'éther (l'opération étant très rapide) et placés sur la table d'opération en decubitus ventral. On fait une incision paramédiane dans la région lombaire, au-dessous de l'insertion de la dernière côte et, à l'aide d'une pince, on découvre le rein droit. On peut alors tirer ce dernier à l'extérieur et le décapsuler. On fait ensuite une ligature en 8 autour des deux

* Nous remercions vivement M. le Professeur CHEVILLARD, MM. GIONO et MASIANI, du Collège de France, qui ont accepté de nous prêter leur concours pour ces expérimentations.

pôles du rein, on remet les organes en place dans la cavité abdominale et on referme l'incision. C'est là le premier temps de l'opération.

Environ 15 jours après cette première intervention, on procède à l'ablation du rein gauche. L'insuffisance rénale consécutive à ce traitement crée une hypertension durable qui atteint son maximum un mois environ après la deuxième opération.

Les variations de la tension artérielle ont été mesurées avant et après l'administration du produit. Les mesures ont été effectuées à l'aide de l'appareil enregistreur de GIONO, CHEVILLARD et KRAUTHAMER. C'est un oscillomètre très sensible, à amplification électronique, qui permet la lecture directe de la pression moyenne et de la pression systolique, en même temps que l'enregistrement sur papier de ces valeurs.

2) *Description de l'appareil :*

Il comprend :

1) un manchon en matière plastique avec poche en latex très souple s'adaptant parfaitement soit à la queue (rat, souris), soit à la patte (lapin, cobaye), soit au doigt de l'homme ;

2) une capsule différentielle dont la membrane agit sur un circuit électrique convertissant les variations de pression en variations de courant ;

3) un amplificateur électronique ;

4) une table enregistreuse, munie d'un moteur synchrone ;

5) un oscillographe à plume pour l'inscription des pulsations ;

6) une capsule oscillographique inscrivant la courbe de la contre-pression exercée sur l'organe à l'aide du manchon ;

7) un manomètre à colonne de mercure ;

8) un vase de détente de l'air comprimé.

3) *Mesure :*

Pour la mesure, le manchon est glissé à la base de la queue puis maintenu en place avec une bande de sparadrap. Le manchon est cylindrique et formé de deux feuillets de latex très souples, le feuillet extérieur étant recouvert par une toile inextensible. Le diamètre intérieur du manchon dépend de la grosseur du rat et la longueur est de 15 mm. L'animal est mis sans contention dans une boîte assez vaste à 2 compartiments pouvant contenir plusieurs animaux ; celle-ci est chauffée électriquement par 1 ou 2 lampes. En effet, la queue du rat est en général, à la température du laboratoire, en vasoconstriction et les oscillations de pression sont très faibles. La queue, grâce au chauffage,

présente alors de la vasodilatation : les meilleurs résultats étaient obtenus à 30°. Le manchon est alors relié par un tube de polyéthylène au circuit de l'appareil de mesure. La compression pneumatique de la queue est faite à vitesse constante en enregistrant simultanément la courbe oscillométrique et celle de la compression. Une lecture instantanée de la pression moyenne et de la pression systolique est faite au manomètre à mercure. Chaque mesure demande environ 15 à 20 secondes et l'animal peut rester branché à l'appareil plusieurs heures sans en souffrir. La valeur de la pression artérielle est déterminée en prenant la moyenne de plusieurs lectures et seuls les enregistrements effectués sur l'animal calme sont utilisables.

4) Résultats :

Les variations de la pression artérielle furent suivies sur une série de 8 rats hypertendus, avant et après injection du produit.

Les 4 premiers rats ont été traités par injection intra-péritonéale, les 4 autres par voie sous-cutanée.

Pression artérielle avant l'essai : 13-18.

On injecte, par voie intra-péritonéale, 1 ml d'une solution aqueuse à 20 mg/ml de substance flavonique à un rat de 200 g (soit 100 mg/kg).

On a pu ainsi enregistrer une chute nette de la pression au bout de 20 à 25 minutes (10-14,5), puis celle-ci remonte légèrement ; mais le lendemain la chute est encore importante, l'animal montrant une pression de 9-13.24 heures après l'injection. On enregistre 11,5-16,5, 36 heures après et enfin 13-18 au bout de 48 heures, c'est-à-dire le retour à la pression initiale.

	Pression moyenne	Pression systolique
Initiale	13	18
Après 20-25'	10	14,5
Après vingt-quatre heures	9	13
Après trente-six heures	11,5	16,5
Après quarante-huit heures	13	18

L'administration par voie intra-péritonéale a donné des résultats comparables sur les 3 autres rats ; l'administration par voie sous-cutanée est venue confirmer ces propriétés.

Conclusion. — Les dérivés flavoniques de la racine de Réglisse possèdent une faible action hypotensive qui semble se décomposer en deux temps :

— d'abord une chute de pression notable, rapide, mais de courte durée, la tension artérielle revenant à une valeur proche de sa valeur initiale dans les deux heures qui suivent l'injection du produit.

— une seconde chute, plus importante, s'établissant plus lentement, mais de durée beaucoup plus longue, la remontée vers la tension initiale ne se produisant que plus de 36 heures après l'injection du produit.

Nous remarquons néanmoins que cette hypotension, telle qu'elle vient d'être décrite, fut obtenue à la dose de 100 mg/kg, c'est-à-dire pour une quantité relativement importante de substance.

En résumé : les dérivés flavoniques de la racine de Réglisse avec lesquels nous avons pu réaliser quelques essais physiologiques, semblent bien doués d'une action antispasmodique et anti-ulcéreuse, en rapport avec l'activité anciennement connue de cette drogue dans la thérapeutique stomacale. Ils possèdent également une légère activité hypotensive, augmentent la résistance et diminuent la perméabilité des capillaires.

B. — Les Œstrogènes

Le test d'ALLEN et DOISY (3) consiste à observer, dans les frottis vaginaux de rates castrées auxquelles on a injecté la substance à étudier, l'apparition de grandes cellules kératinisées sans noyau et la disparition de la plupart des leucocytes de l'exsudat vaginal de ces animaux. Ce phénomène témoigne de l'activité oestrogène du produit étudié.

Des rates adultes de 120-140 g sont ovariectomisées et, pendant un repos de trois semaines, l'absence de cycle ovarien est contrôlée par examen des frottis vaginaux. Elles sont alors réunies en lots de dix. Un premier lot reçoit la substance à étudier en injection sous-cutanée, le second lot, dit témoin, recevant une solution de folliculine étalon titrée. 48 heures après l'injection, les frottis vaginaux des deux lots sont examinés au microscope après coloration. On procède alors, après un repos de 8 jours, à l'essai croisé, injectant au lot n° 1 la solution de folliculine étalon et au lot n° 2 la substance essayée ; de nouveau, au bout de 48 heures, les prélèvements vaginaux sont examinés. On note, dans les deux cas, le pourcentage de rates ayant réagi positivement par la production de cellules kératinisées. Les résultats sont exprimés, par rapport aux animaux qui ont reçu la folliculine étalon, en unités internationales, 10 unités correspondant à 1 γ de cette hormone.

En ce qui concerne nos recherches personnelles, elles furent effectuées

sur un même lot de racines d'origine turque. Un extrait alcoolique total fut tout d'abord essayé et injecté aux animaux par voie sous-cutanée, une série d'animaux témoins recevant une solution huileuse de folliculine étalon titrant 5 Unités Internationales par ml. L'activité de l'extrait de Réglisse est telle que 1 g de plante renferme plus de 5 U. I. de substance oestrogène (activité comparable à celle de la poudre d'ovaire), 60 % des animaux présentant un test positif alors que les témoins furent tous négatifs avec 5 U. I. de folliculine étalon. Désormais la solution étalon utilisée titrera 10 U. I. par ml. A noter que deux jours après l'injection de cet extrait total plusieurs rates ont présenté des escarres importantes au point d'injection et que l'une d'elles eut même un abcès.

Nous n'avons pas poursuivi l'étude du principe antihormonal signalé par COSTELLO et LYNN, mais cherché surtout à isoler des fractions plus actives.

La racine de Réglisse épuisée au Soxhlet par l'éther de pétrole fournit, nous l'avons vu, un résidu grassex de nature stérolique (voir essais préliminaires). Ce résidu, repris par de l'huile d'olive neutralisée, provoque l'oestrus : après examen des frottis vaginaux, 0,5 ml de solution huileuse injectée à chaque rate détermine une moyenne de 65 % de réponses positives, 75 % des animaux ayant réagi à la folliculine étalon. Les témoins ayant reçu 1 ml de solution huileuse à 10 U. I. de folliculine étalon et les autres, 0,5 ml de la solution de Réglisse, on peut en conclure que 1 ml de cette solution correspondant à 10 g de plante renferme 17,35 U. I. de substance oestrogène.

A noter qu'aucune réaction locale ne s'est manifestée au lieu d'injection et que l'action du produit est un peu plus lente à se manifester que celle de la folliculine.

Le même échantillon de la drogue, épuisé ensuite par le chloroforme, se révèle également actif. Le résidu, après évaporation du solvant, est très difficilement remis en solution injectable aux animaux. Avec l'alcool à 30°, il se forme un important précipité. La dissolution dans le propylène-glycol est facile mais ce solvant est toxique. Finalement le résidu est mis au contact d'huile d'olive neutralisée pendant 4 heures au bain-marie bouillant. Après filtration, le liquide est injecté aux rates par voie sous-cutanée, aux mêmes doses que précédemment.

Cette fraction s'est révélée moins active que la précédente ; 45 % des animaux ont réagi, ce qui correspond à une activité oestrogène de 12,85 U. I. par ml. Ces rates ont présenté, en outre, au point d'administration, d'abord une petite induration débutant 3 à 4 jours après l'injection, puis un escarre important, long à se cicatriser. Il semble que ces

accidents soient dus aux résines extraites de la plante par le chloroforme.

D'autre part, un extrait alcoolique, préparé à partir de la drogue déjà épuisée par l'éther de pétrole puis le chloroforme n'a plus montré aucune activité oestrogène. Chez les 2 lots de 10 animaux injectés, on n'a pu constater ni kératinisation, ni réaction locale au lieu d'injection. Les substances oestrogéniques, vraisemblablement de nature stérolique, se trouvent donc surtout dans l'extrait éthéro-pétrolique de la drogue et dans les résines extraites par le chloroforme, résidus pour lesquels la réaction de Liebermann est positive. Enfin nous avons injecté aux rates des solutions de glycyrrhizine pure et de dérivés flavoniques qui se sont montrées totalement inactives. Les extraits éthéro-pétrolique et chloroformique ne renfermant aucune trace de dérivé flavonique, l'activité oestrogène de la Régliasse n'a donc aucun rapport avec ces dernières substances.

Nous avons choisi l'extrait éthéro-pétrolique pour le fractionnement selon BUTENANDT qui a permis de séparer 0.005 % de phénols totaux actifs.

Cette dernière fraction a alors été étudiée en chromatographie sur papier (voir p. 114). Après essai de nombreux révélateurs et solvants, une séparation assez nette a été obtenue : deux taches, dont les Rf sont très voisins de ceux de l'oestrone et de l'oestradiol, alors que par l'étude du spectre d'absorption COSTELLO et LYNN avaient conclu à la présence d'oestriol.

Nous avons alors soumis les produits de ce dernier fractionnement sur papier à une dernière expérimentation.

Sur des bandes de papier Whatman n° 1 ont été déposées, non plus des taches, mais de longues traînées. Les bandes furent traitées selon la technique de chromatographie descendante de HEUSCHEM. Après séchage, une bande longitudinale très étroite fut seule révélée au trichlorure d'antimoine et, après examen en lumière ultraviolette, les feuilles furent découpées transversalement de manière à ne conserver que les parties correspondantes aux substances de Rf 0,78 et 0,92. Ces bandes, roulées, sont éluées par l'acétone pendant 4 heures à l'appareil de Kumagawa. La solution acétonique jaune pâle est concentrée à sec et le résidu, repris par de l'huile d'olive neutralisée, est injecté à des rates castrées. L'essai, nettement positif, montre que la chromatographie a permis une bonne séparation des substances oestrogènes.

CONCLUSIONS GÉNÉRALES

La première partie de ce travail a trait à des généralités sur la Réglisse. Au point de vue botanique, la drogue est surtout constituée par la racine et le rhizome de *Glycyrrhiza glabra* et de ses variétés, quelques espèces voisines étant accessoirement utilisées.

Au point de vue chimique, parmi les constituants actifs de cette drogue, le mieux connu est son principe sucré, la glycyrrhizine, saponoside hydrolysable en une molécule d'un acide triterpénique, l'acide glycyrrhétique et deux molécules d'acides uroniques dont la nature est encore discutée ; d'autre part, des dérivés flavoniques ont été caractérisés : une flavanone, le liquiritoside, isolé en 1934, et une chalcone isomère, l'iso-liquiritoside, séparée tout récemment alors que ce travail était en cours ; enfin des principes oestrogènes y ont été mis en évidence ces dernières années. Les emplois de la Réglisse en médecine populaire ainsi que ses principales propriétés physiologiques ont été ensuite rappelés. Connue depuis l'Antiquité, cette drogue a été l'objet de travaux récents qui ont montré ses propriétés antispasmodiques et anti-ulcères gastriques, son action « cortisone-like » et son pouvoir oestrogène.

Au cours des travaux personnels, quelques essais préliminaires ont été effectués sur des échantillons d'origines géographiques différentes (Espagne, Iran, Russie, Turquie, Yougoslavie, etc...) : détermination des teneurs en eau et en cendres, extractions par différents solvants qui ont permis d'orienter la séparation des dérivés flavoniques, de la glycyrrhizine et des substances oestrogènes.

C'est à l'étude des flavonoïdes qu'a été consacrée une grande partie de ce travail. Leur extraction, extrêmement laborieuse et délicate, fut essayée à partir de racines fraîches et sèches et par différentes méthodes : épuisement par l'alcool, extraction à chaud dans l'appareil de Soxhlet, lixiviation à froid, séparation à l'état de dérivés plombiques. C'est la lixiviation à partir de la plante sèche qui a donné les meilleurs résultats. Il est préférable d'éliminer les lipides, stérols et résines par un traitement préalable par l'éther de pétrole et le chloroforme. Les dérivés flavoniques bruts peuvent alors être extraits par l'acétate d'éthyle

pur ou additionné de 5 à 10 % d'éthanol ou de méthanol. La concentration sous pression réduite de ces liqueurs amène la précipitation des flavones brutes sous forme d'une poudre jaunâtre hygroscopique (rendement 1 à 1,50 % environ). Le fractionnement des flavonoïdes bruts a été tenté d'abord par épuisement à l'aide de différents solvants dans un micro-kumagawa ; les résultats n'ayant pas été très satisfaisants, la chromatographie sur colonne a été utilisée. En chromatographie d'adsorption de nombreux essais ont été réalisés, avec la poudre de cellulose anhydre, le silicate de magnésium, le kieselguhr, et en chromatographie de partage, avec la poudre de cellulose hydratée. L'élution par l'acétate d'éthyle pur ou additionné d'alcool permet dans le premier cas de recueillir des dérivés flavoniques purifiés (mélange, cependant, de flavanone et de chalcone). En chromatographie de partage, l'élution par l'acétate d'éthyle additionné de 10 % de chloroforme et saturé d'eau a fourni la chalcone seule, la flavanone étant ensuite élue par l'acétate d'éthyle saturé d'eau. Les rendements en produits purs sont très faibles (10 à 20 % des flavonoïdes bruts) et les deux isomères sont difficilement séparables.

L'étude physico-chimique des deux dérivés purs a été effectuée. Le liquiritoside est une poudre micro-cristalline, blanc ivoire, de point de fusion instantané : 138-140° : l'iso-liquiritoside est d'un jaune vif (point de fusion instantané : 172°). En chromatographie sur papier, ces deux hétérosides ont des Rf nettement distincts dans l'acide acétique à 15 %. Leurs spectres d'absorption dans l'ultra-violet et l'infra-rouge présentent quelques différences en relation avec leur structure flavanonique ou chalconique avec ouverture du noyau pyrone. Quelques réactions colorées permettent de les différencier nettement : seul le liquiritoside donne une coloration violacée par la réaction dite de la cyanidine ; son isomère chalconique présente une fluorescence intense jaune vif avec le réactif citro-borique de WILSON, fluorescence qui n'existe pas dans le cas de la flavanone. Les résultats de l'analyse élémentaire des deux produits isolés à l'état pur permettent d'attribuer à chacun des deux hétérosides une formule brute en $C_{27}H_{32}O_3 \cdot 2H_2O$. Par hydrolyse acide, en milieu hydro-alcoolique, on obtient par suite de l'isomérisation de la chalcone en milieu acide, pour ces deux substances, la même génine flavanonique cristallisée (point de fusion instantané : 207°) en $C_{15}H_{12}O_4$, dont le spectre ultra-violet, le Rf dans différents solvants, les réactions colorées sont indiqués. Les sucres ont pu être identifiés, par chromatographie sur papier et par leurs osazones, au glucose et au rhamnose, ce dernier n'ayant pas encore été signalé avant nous. Dans les préparations

galéniques de Réglisse (poudre, suc) les flavonoïdes peuvent être décelés en chromatographie sur papier en lumière ultra-violette et après révélation par la potasse et le chlorure d'aluminium. Le liquiritoside a été dosé colorimétriquement en mettant à profit la réaction de la cyanidine dans des conditions bien déterminées. L'iso-liquiritoside a pu être évalué pondéralement à l'état de 2. 4. dinitrophénylhydrazone.

Un chapitre de ce travail a été consacré à la caractérisation et au dosage de la glycyrrhizine, qu'il est préférable d'éliminer en partie de certaines préparations de Réglisse en raison des inconvénients (œdèmes...) qu'elle amène à haute dose. Différentes réactions colorées dues soit aux groupements uroniques, soit au noyau triterpénique, ont été passées en revue. Parmi les méthodes de dosage, ont été comparées les méthodes pondérales de VIRATELLE et de la Pharmacopée française et les méthodes colorimétriques de FUCHS (au naphtho-résorcinol, due aux acides uroniques) et de WIEST (à la vanilline en milieu sulfurique, due au noyau triterpénique), qui donnent d'ailleurs des résultats assez discordants.

Des essais de séparation des principes oestrogènes, actifs par voie buccale, de la Réglisse ont également été effectués. Extraits de la drogue par l'éther de pétrole, ils ont été fractionnés par la méthode de BUTENANDT et se comportent comme des substances phénoliques ; le test physiologique d'ALLEN et DOISY, sur la rate castrée, a permis de suivre l'activité des différents produits obtenus. Finalement, la chromatographie sur papier a permis de séparer deux substances assez voisines par leur Rf, respectivement, de l'oestradiol et de la folliculine ou oestrone.

Enfin, l'étude physiologique a porté essentiellement sur les dérivés flavoniques totaux dont la toxicité aiguë et chronique s'est révélée très faible. Une action dépressive a été mise en évidence sur les contractions normales de l'intestin isolé de lapin, et une action antispasmodique nette sur l'intestin soumis préalablement à l'acétylcholine, l'histamine ou le chlorure de baryum. En outre, un effet protecteur vis-à-vis de l'ulcère gastrique expérimental créé chez le rat par ligature du pylore (méthode de SHAY) a été constaté. Il se manifeste à la fois par une diminution de la fréquence et de la gravité des lésions. D'autre part, comme beaucoup de flavonoïdes, ceux de la Réglisse augmentent la résistance et diminuent la perméabilité capillaires chez le lapin et le cobaye. Enfin, chez le rat en hypertension expérimentale (par la méthode d'ischémie rénale) une légère action hypotensive a été enregistrée au moyen de l'oscillomètre enregistreur de GIONO, CHEVILLARD et KRAUTHAMER.

Nous regrettons que la difficulté d'obtention à l'état pur des deux

flavonoïdes de la Réglisse ne nous ait pas permis de comparer les effets respectifs des deux hétérosides isomères. Nous espérons reprendre ce travail dans l'avenir et parvenir, d'autre part, à séparer à l'état cristallisé les oestrogènes, séparation difficile du fait des très faibles quantités présentes dans la drogue.

Ainsi il existe, dans la Réglisse, des constituants de nature chimique très diverse, dont on commence à mettre en évidence les effets physiologiques particuliers. Ce travail contribuera, nous le souhaitons, à une meilleure connaissance de l'une des drogues végétales les plus anciennement connues.

Vu, le Doyen,
R. FABRE.

Vu, le Président de Thèse,
R. PARIS.

Vu et permis d'imprimer,
le Recteur de l'Académie de Paris,
J. SARRAILH.

INDEX BIBLIOGRAPHIQUE

1. ADAMS (A. V.). — Pharmacologie de la Réglisse. *Nouveautés médicales*, 1954, 3, 479.
2. ALIBERT (J. L.). — Nouveaux éléments de Thérapeutique et de Matière médicale, Paris, 1808, 1, 648-650 ; 1826, 1, 563.
3. ALLEN (E.) et DOISY (E. A.). — An Ovarian Hormone. Preliminary report on its localization, extraction and partial purification, and action in test animals. *J. amer. med. Assoc.*, 1923, 81, 819-821.
4. AMBROSE (A. M.) et DE EDS (F.). — Effect of rutin on permeability of cutaneous capillaries. *J. Pharmacol. exp. Therap.*, 1947, 90, 359-363.
5. ASTRUC (A.) et PICHARD (G.). — Sur le dosage pondéral de la glycizine. *J. Pharm. Chim.*, 1918, 18, 289-290.
6. AXELROD (L. R.). — The quantitative separation of estrogens by paper partition chromatography. *J. of biol. Chem.*, 1953, 201, 59-69.
7. AXELROD (L. R.). — The separation and identification of mixtures of C²¹ and C¹⁹ stéroïds by paper chromatography. *J. of biol. Chem.*, 1953, 205, 173-184.
8. BAYTOP (T.). — De la composition chimique de la racine et du suc de Réglisse d'Anatolie. *Mat. Vegetabiles*, 1954, 1, 369.
9. BEATON (J. M.) et SPRING (F. S.). — The isolation and characterisation of glabric acid, a new triterpenoid acid from Licorice root. *J. Chem. Soc.*, 1956, 2, 2417-2419.
10. BENIGNI (R.) et FRANCO (E.). — Sur l'action pharmacologique de l'acide glycyrrhétique et sur ses applications thérapeutiques. Recherches sur l'action bactériostatique de l'acide β -glycyrrhétique et de quelques-uns de ses dérivés. *Pharm. Weekbl.*, 1958, 93, 114-118.
11. BERGER (H.) et HÖLLER (H.). — Zür spasmolytischen Wirkung handelsüblichen Succus-Liquiritiae-Sorten. *Scientia Pharm.*, 1955, 23, 145-148.
12. BERGER (H.) et HÖLLER (H.). — Succus Liquiritiae in der Therapie. *Scientia Pharm.*, 1955, 23, 157-163.
13. BERGER (H.) et HÖLLER (H.). — Die spasmolytischen Wirkstoffe von *Glycyrrhiza glabra* L... *Scientia Pharm.*, 1957, 25, 172-176.
14. BERGMANN (F.). — Ueber das enzymatische Verhalten von Glucuroniden und über Glycyrrhizinsäure. *Biochem. Z.*, 1933, 267, 296-308.
15. BERTOLO (P.). — Sopra alcune reazioni della glicirrizina. *Giorn. Chim. Ind.*, 1925, 7, 404-405.
16. BIJLSMA (U. G.), NELEMANS (F.), STAMPERIUS (J. A. E.). — Nadere mededeling over succus liquiritiae. *Ned. Tijdschr. Geneesk.*, 1948, 92 (4), 3569-3570.
17. BILHAM (P.), KON (G. A. R.) et ROSS (W. C. J.). — The constitution of glycyrrhetic acid and its relation to oleanolic acid. *J. Chem. Soc.*, 1942, 2, 535-539.

18. BOISSIER (E.). — *Flora Orientalis*. Georg. edit., Lyon, 1872, 2, 202.
19. BORST (J. G. G.), HOLT (S. P. ten), VRIES (L. A.) et MOLHUYSEN (J. A.). — Liquorice and Cortisone in Addison's and Simmond's Disease. *J. Pharm. Pharmacol.*, 1953, 5, 652.
20. BRIESKORN (C. H.) et BRINER (M.). — Ueber einen histochemischen Nachweis vor Triterpenen in Pflanzen. *Pharm. Acta Helv.*, 1953, 28, 139-143.
21. BURTON (R. B.), ZAFFARONI (A.) et KEUTMANN (E. H.). — Paper chromatography of steroids. *J. of biol. Chem.*, 1951, 188, 763-771.
22. BUSACCA (R.). — Ricerche sull'azione emolitica della glicirrizina. *Arch. di Farmacol. Sper.*, 1931, 53, 66-71.
23. BUSQUET (H.). Action modératrice de la Réglisse sur la contractibilité de l'intestin isolé. *Bull. gén. Thérap.*, 1932, 183, 115.
24. BUTENANDT (A.) et JACOBI (H.). — Ueber die Darstellung eines krystalliseirten pflanzlichen Tokokinins (Thelekynins) und seine Identifizierung mit dem α -Follikelhormon. *Zeitsch. f. physiol. Chem.*, 1933, 218, 104.
25. BUTENANDT (A.). — Zur Charakterisierung des oestrogen wirksamen Tokokinins aus *Butea superba*. *Naturwiss.*, 1940, 28, 533.
26. CANDOLLE (A. P. de). — *Prodromus systematis naturalis regni vegetabilis*. Paris, 1825, 2, 248.
27. CAPIN (J.). — Contribution à l'étude chimique et pharmaceutique de la Glyzine ou glycyrrhizate d'ammoniaque. *Thèse Doct. Univ. (Pharm.)*, Bordeaux, 1911.
28. CARD (W. I.), MITCHELL (W.), STRONG (J. A.), TAYLOR (N. R. W.), TOMPSETT (S. L.) et WILSON (J. M. G.). — Effects of Liquorice and glycyrrhetic acid on salt and water metabolism. *J. Pharm. Pharmacol.*, 1953, 5, 652.
29. CEDERBERG (K. H.). — Untersuchungen über Glycyrrhizin und andere Bestandteile im Süssholz. *Thèse Doct. Sc.*, Berne, 1907.
30. CEDERBERG (K. H.). — Determination of glycyrrhizic acid in Licorice preparation. *Svensk Farm. Tid.*, 1927, 31, 361-363.
31. CHARPY (J.) et CASTELAIN (P. Y.). — Essais de préparations externes à base d'acide glycyrrhétinique comme traitement anti-inflammatoire. *Presse méd.*, 1957, 1000.
32. CHAUMETON (F. P.), CHAMBERET et POIRET. — Flore médicale. Panckoucke, édit., Paris, 1818, 6, 9-12.
33. CHEVILLARD (L.), GIONO (H.) et MASSIANI F.). — Mesure indirecte par méthode oscillométrique de la pression artérielle chez le Rat. *C. R. Soc. Biol.*, 1954, 148, 877-880.
34. CORMINBEUF (H.). — Determination of glycyrrhizic acid in commercial ammonium glycyrrhizate. *Ann. Chim. anal.*, 1912, 17, 47-50.
35. COSTELLO (C. H.) et LYNN (E. V.). — Estrogenic substances from plants : *Glycyrrhiza*. *J. of amer. pharm. Assoc.*, 1950, 39, 177-180.
36. CULLOUGH (M. L.). — *Glycyrrhiza lepidota* (Nuttall.) *Amer. J. of Pharm.* 1890, 62, 388-389.
37. DESMAREZ (J. J.). — A propos de l'inhibition de la sécrétion gastrique et de l'action anti-ulcéreuse des extraits de Réglisse ou d'Ipéca. *C. R. Soc. Biol.*, 1956, 150, 1022-1023.
38. DIOSCORIDE (P.). — *De Materia medica*. Lib. III, Cap. VII.
39. DJERASSI (C.) et FOLTZ (C. M.). — Terpenoids. Experiments in the glycyrrhetic acid series. *J. amer. chem. Soc.*, 1954, 76, 4085-4088.

40. DOHRN (M.), FAURE (W.), POLL (H.) et BLOTEVOGEL (W.). — Tokokinine, Stoffe mit sexualhormonartiger Wirkung aus Pflanzenzellen. *Med. Klin.*, 1926, n° 37, 1397-1399.
41. DOUGLASS (C. D.), MORRIS (Q. L.) et WENDER (S. H.). — The 2.4-dinitrophenylhydrazones of some flavanones. *J. amer. chem. Soc.*, 1951, 73, 4023.
42. DURIER (E.). — Dosage de la glycyrrhizine dans les bonbons et les sucs de Réglisse. *Ann. Fals.*, 1913, 6, 252-255.
43. DUTTA (N. L.). — Separation of saponins by paper chromatography. *Nature*, 1955, 175, 85.
44. EBERLEIN (W. R.) et BONGIOVANNI (A. M.). — New solvent systems for the resolution of corticosteroids by paper chromatography. *Arch. Biochim. Biophysics*, 1955, 59, 90-96.
45. EDER (R.) et SACK (A.). — Quantitative Bestimmung der Glycyrrhizinsäure in Radix und Succus Liquiritiae. *Pharm. Acta Helv.*, 1929, 4, 23-48.
46. EERENS (J.). — Le Succus Liquiritiae dans la thérapeutique des ulcères de l'estomac et des intestins. *J. Pharm. Belgique*, 1953, 35, 207 et 392.
47. ERIKSSON (E.). — Bestimmung des Glycyrrhizins und der Zuckerarten im Süßholzpulver und Süßholzextrakt. *Arch. Pharm.*, 1911, 249, 144-160.
48. FAIRBAIRN (J. W.). — Some recent advances in the knowledge of the constituents of vegetable drugs. *J. Pharm. Pharmacol.*, 1953, 5, 281-291.
49. FELLNER (O.). — Zuckerstoffwechsel, Sexualorgane und Insulin. *Med. Klin.*, 1926, n° 49, 1854-1856.
50. FROMME (G.). — Zusammenstellung von Vorschriften und Methoden zur Wertbestimmung von Drogen. *Jahresber. der Caesar und Loretz A. G.*, 1924, 233-306.
51. FUCHS (L.) et TRAUNER-ADELPOLLER (J.). — Eine kolorimetrische Methode zur Bestimmung des Glycyrrhizinsäuregehaltes der Radix Liquiritiae. *Scientia Pharm.*, 1947, 1, 2-17.
52. FUJITA et TSUDA. — Communication, Hauptsitzung des Pharmazeut. Vereins, avril 1931 (d'après SHINODA et UEEDA).
53. GALAL (E. E.). — The effects of Glycyrrhetic acid on salt and water metabolism. *Brit. Journ. Pharmacol.*, 1955, 10, 305-313.
54. GIONO (H.) et CHEVILLARD (L.). — Mesure indirecte de la pression artérielle chez les petits animaux. *J. Physiol. Pathol. gén.*, 1953, 45, 120-123.
55. GLASER (E.) et DROBNIK (R.). — Beiträge zur Kenntniss der Wirkstoffe des Knoblauchs. *Arch. exp. Path. Pharmacol.*, 1939, 193, 1-9.
56. GOOTJES (J.) et NAUTA (W. Th.). — A new colour reaction for the using paper chromatography. *Rec. Trav. Chim. Pays-Bas*, 1954, 73, 886-891.
57. GORSE (J. M.). — Traitement des gastrites par la Réglisse. *Presse méd.*, 1953, 61, 638.
58. GORUP-BESANEZ (E.). — Zur Kenntniss des Glycyrrhizins. *Ann. der Chem. und Pharm.*, 1861, 118, 236-247.
59. GOSSET (J. R.). — La Réglisse en gastro-entérologie. *Concours méd.*, 1954, n° 4, 325-326.
60. GOTO (T.), NAKAJIMA (I.) et OOKI (R.). — Cardiac action of glycyrrhetic acid. *Japan J. Pharm. Chem.*, 1950, 22, 418-419.
61. GROEN (J.), PELSER (H.), WILLEBRANDS (A. F.) et KAMMINGA (C. E.). — Liquorice extract for the treatment of Addison's disease. *J. Pharm. Pharmacol.* 1951, 3, 862.

62. GROEN (J.), PELSER (H. E.), WILLEBRANDS (A. F.), VEER (W. L. C.) et Van der KERK (G. J. M.). — Effect van derivaten en analoga van glycyrrhetinezuur op de water — en zout — huishouding bij de ziekte van Addison. *Ned. Tijdschr. Geneesk.* 1953, 97 (4), 3290-3300.
63. GUTMANN (R. H.) et KANOUI (F.). — Essai de traitement des gastrites et ulcères gastroduodénaux par la Réglisse. *Arch. Mal. tube dig. nutr.*, 1953, 42, 563-570.
64. HASSAN (W. E.), PALUMBO (J. F.) et ELMADJIAN (F.). — The electrolytic effects of Licorice preparations in the adrenalectomized rat. *J. amer. pharm. Ass.*, 1954, 43, 551-554.
65. HASSAN (A.) et Wafa (A. E.). — An oestrogenic substance in pollen grains of Date Palm tree, *Phoenix dactylifera* L., Palmae. *Nature*, 1947, 159, 409-410.
66. HENNEMANN (H.) et KUNERT (G.). — Die Rolle der Glycyrrhizinsäure bei der Behandlung des Ulcus pepticum mit Succus Liquiritiae. *Die Pharmazie*, 1953, 8, 463-467 et 725.
67. HEUSCHEM (C.). — Paper partition chromatography of natural oestrogens. *Nature*, 1953, 171, 42-43.
68. HOCKING (G. M.). — A Dictionary of Terms in Pharmacognosy. Springfield, Illinois, Thomas, édit., 1955, 95.
69. HOLLER et SCHIRMER (K.). — Experimentelle Untersuchungen über den Anti-ulkusfaktor im Succus liquiritiae. *Wien. med. Wschr.*, 1952, 102, 423-424.
70. HOUSEMANN (A.). — The constituents of licorice root and of licorice extract. *Amer. J. Pharm.*, 1912, 84, 531-546 et 1916, 88, 97-105.
71. HOUSEMANN (A.). — Studies on licorice root and licorice extract. *Amer. J. Pharm.*, 1921, 93, 481, 495.
72. HUDSON (P. B.), HITTELMAN (A.) et PODBEREZEL (M.). — Use of glycyrrhizin after bilateral adrenalectomy. *New Engl. J. Med.*, 1954, 251, 641-646.
73. IRLE (Dr F.). — Beobachtungen bei der ambulantes Röntgenuntersuchung des Magres — und Zwölffnigerdarm — Geschwürs vor und nach der Behandlung mit Succus liquiritiae. *Münch. med. Wschr.* 1952, 94, 1173-1176.
74. JANOT (M. M.) et MOUTON (M.). — Dosage pondéral de la santoline dans le semen-contra. Emploi de la 2.4-dinitrophényl-hydrazine. *Bull. Sc. pharmacol.*, 1936, 43, 708.
75. JELLINEK (P. H.). — Paper Chromatography of Oestrogens. *Nature*, 1953, 171, 750-751.
76. KARRER (P.), KARRER (W.) et CHAO (J. C.). — Beitrag zur Kenntniss des Glycyrrhizins. *Helv. Chim. Acta*, 1921, 4, 100-112.
77. KATWIJK (V. M. Van) et HUIS IN'T VELD (L. G.). — Metabolism of Glycyrrhetic acid in human subjects. *Nature*, 1954, 173, 733.
78. KÖHLER (K.). — Die Zubereitung von glycyrrhizinfreiem Succus Liquiritiae. *Die Pharmazie*, 1954, 9, 770.
79. KRAUTHAMER (S.). — Description technique de l'oscillomètre électronique. *J. Physiol. Pathol. gén.*, 1953, 45, 124.
80. KUNERT (G.). — Über den Glycyrrhizinfreiem Süssholzsafte. *Die Pharmazie*, 1954, 9, 591-592.
81. LA BARRE (J.) et DESMAREZ (J. J.). — Action protectrice de divers agents pharmacologiques d'origine végétale sur l'ulcère gastrique expérimental. *Journées thérapeutiques*, 1956, 37, 40.

82. LADE (T.). — Ueber Glycyrrhizin. *Ann. Chem. Pharm.*, 1846, 58, 224-233.
83. LAUMONT (P.). — Notes sur quelques plantes de « Petite Culture » intéressantes pour l'Algérie. *Bull. OFALAC*, 1950, n° 158, 53-54.
84. LECLERC (H.). — A propos de l'action modératrice de la Réglisse sur la contractilité de l'intestin. *Presse méd.*, 1932, 1086.
85. LECLERC (H.). — Histoire et pharmacologie de la Réglisse. *Revue de Phytothérapie*, 1943, 35-39.
86. LINNÉ (Carolus Von). — *Species Plantarum*. Holmiae, 1753, 742.
87. LINZ (A.). — Comparative investigation of suggested methods for the determination of glycyrrhizin in licorice and in Succus Liquiritiae. *Arch. Pharm.*, 1916, 254, 65-134.
88. LOEWE (S.), LANGE (F.) et SPOHR (E.). — Ueber Weibliche Sexualhormone (Thelytropine). *Biochem. Zeitsch.*, 1927, 180, 1-26.
89. LOUIS (L. H.), CONN (J. W.) et ARBOR (A.). — Preparation of Glycyrrhizinic acid, the electrolyte-active principle of Licorice : its effects upon metabolism and upon pituitary-adrenal function in man. *J. of Lab. and Clin. med.*, 1956, 47, 20-28.
90. LYTCHGOE (B.) et TRIPPETT (S.). — Constitution of the disaccharide of glycyrrhizic acid. *J. Chem. Soc.*, 1950, 1983-1990.
91. MAGROU (E.). — Contribution à l'étude de la racine de Réglisse et de son principe sucré. *Thèse Doct. Univ. (Pharm.)*, Montpellier, 1885.
92. MARINI (G. B.), BETTOLO (L.), FALCO (M. R.). — Ricerche sui pigmenti delle Mimosacee del Sud-America. Naringenina da una *Acacia longifolia* del Rio de la Plata. *Ann. Chim. appl.*, 1951, 41, 221-226.
93. MARRIAN (G. F.). — An improved method of preparation and the isolation of active crystalline material. *Biochem. J.*, 1930, 24, 435.
94. MITCHELL (W.). — Cortisone like products from licorice. *Nat. Research. Develop. Corps. Brit.*, 1955, 724, 230.
95. MITCHELL (W.). — Liquorice and glycyrrhetic acid. *Manuf. Chemist.*, 1956, 27, 169-172.
96. MOLHUYSEN (J. A.), GERBRANDY (J.), de VRIES (L. A.), de JONG (J. C.), LENS-TRA (J. B.), TURNER (K. P.) et BORST (J. G. G.). — Liquorice extract, Deoxycortone-like Action of. *J. Pharm. Pharmacol.*, 1951, 3, 189.
97. MUCH (H.). — Weitere medizinische Pflanzenforschungen in neuem Lichte. *Münch. med. Wschr.*, 1931, 78, 1992-1993.
98. NELEMANS-STAMPERIUS (J. A. E.). — Succus liquiritiae eu maagzweren (En pharmacologisch onderzoek). *Thèse Doct. Méd.*, Utrecht, 1949.
99. NIEMAN (C.). — De structuur van glycyrrhizinezuur. *Chem. Weekblad*, 1952, 48, 213.
100. NISHIYAMA (T.). — Deoxycorticosterone (D. O. C.) like effect and the therapeutic effect on peptic ulcer of Licorice. *Igaku Kenkyu*, 1955, 25, 366-380.
101. PARIS (R.). — Les oestrogènes végétaux : le Ginseng et ses succédanés. *Thérapie*, 1946, 1, 176.
102. PARIS (R.). — Le rutoside (rutine). Sa préparation à partir de diverses espèces et variétés de Sarrasin cultivées en France. *Ann. pharm. fr.*, 1949, 7, 21.
103. PARIS (R.) et VAIREL (E. G.). — Action comparée du rutoside et de quelques dérivés flavoniques sur la résistance et la perméabilité des capillaires. *Ann. pharm. fr.*, 1949, 7, 510.

104. PARIS (R.). — Acquisitions récentes en Phytothérapie, in *Actualités pharmacologiques publiées sous la direction de R. HAZARD*. Masson, édit., 1956, 9^e s., 143.
105. PARIS (R.) et CORNILLEAU (M^{lle} J.). — Caractérisation et dosage des dérivés flavoniques. *Ann. pharm. fr.*, 1955, 13, 192-199.
106. PARIS (R.) et GUILLLOT (M^{lle} M.). — Sur le liquiritoside, flavonoside de la racine de Réglisse (*Glycyrrhiza glabra* L.). *Ann. pharm. fr.*, 1955, 13, 592.
107. PARIS (R.). — Action de la rutine et du quercétol sur l'ulcère gastrique expérimental chez le rat. *C. R. Acad. Sc.*, 1958, 246, 2183.
108. PASTEUR-VALLÉRY-RADOT (L.), HALPERN (B. N.) et MARTIN (L.). — Recherches expérimentales sur la production de l'ulcère et de la perforation gastrique par l'histamine. *Presse méd.*, 1947, 55, 185-186.
109. PELSER (H. E.), WILLEBRANDS (A. F.), FRENKEL (M.), VAN DER HEIDE (R. M.) et GROEN (J.). — Onderzoekingen over de electrolythuishouding tijdens de behandeling van de ziekte van Addison met Glycyrrhizinezuur en Glycyrrhetinezuur. *Ned. Tijdschr. Geneesk.*, 1953, 97 (1), 348-359 ; 1953, 97 (3), 1900-1905.
110. PESEZ (M.) et POIRIER (P.). — Méthodes et réactions de l'analyse organique. Masson, éd., Paris, 1953, 146-165.
111. PEYER (W.). — Die Untersuchung und Wertbestimmung von Succus Liquiritiae. *Apoth. Ztg.*, 1925, 40, 501-504.
112. PFAFF (C. H.). — System der Mat. med., 1, 187.
113. PICHARD (M^{lle} G.). — Etude pharmacologique de la Réglisse. *Th. Doct. Univ. (Pharm.)*, Montpellier, 1918.
114. PINCUS (G.). — Analysis of human urines for steroids substances. *J. Clin. Endocrinol.*, 1945, 5, 291-300.
115. PLINE. — Historia Naturalis. Lib., XXII, Cap. XI.
116. PORTER (W. L.), DICKEL (A.) et COUCH (J. F.). — Determination of added rutin in urin. *Arch. Bioch. U. S. A.*, 1949, 21, 273-278 et *Bull. anal.*, 1949, 10, 3088.
117. PURI (B.) et SESHADRI (T. R.). — Coloring matter of Licorice roots. *J. of Sc. and Industr. Res.*, 1954, 13 A.
118. REVERS (F. E.). — Heeft Succus Liquiritiae een genezende werking op de maagzweer ? *Ned. Tijdschr. Geneesk.*, 1946, 90 (1), 135-137.
De behandeling van ulcus ventriculi en ulcus duodeni met Succus Liquiritiae. *Ned. Tijdschr. Geneesk.*, 1948, 92 (3), 2968-2973 ; 1948, 92 (4), 3567-3569.
119. REVERS (F. E.). — Enige eigenschappen van Succus Liquiritiae. *Ned. Tijdschr. Geneesk.*, 1951, 95 (1), 120-124 ; 1952, 96 (3), 2338-2341.
120. ROBIQUET (P. J.). — Analyse de la Réglisse. *Ann. Chim.*, 1809, 72, 143-159.
121. ROUSSIN (Z.). — Sur la nature de la matière sucrée de la racine de Réglisse. Combinaison ammoniacale de la glycyrrhizine. *J. Pharm. Chim.*, 1875, 22, 6-15.
122. RUZICKA (L.) et LEUENBERGER (H.). — Zur Kenntniss der Glycyrrhetinsäure. *Helv. Chim. Acta*, 1936, 19, 1402-1406.
123. RUZICKA (L.) et JÉGER (O.). — Zur Lage der Carboxylgruppe bei der Glycyrrhetinsäure. *Helv. Chim. Acta*, 1942, 25, 775-785.
124. RUZICKA (L.), JÉGER (O.) et WINTER (M.). — Zur Lage der Carboxylgruppe bei der Oleanolsäure und der Glycyrrhetinsäure. *Helv. Chim. Acta*, 1943, 26, 265-279.

125. SAG (G.). — Sur la composition des racines et des sucs de Réglisse. *Rev. Bot. appl. Agr. trop.*, 1952, 32, 570-574.
126. SCHULZE (E.), FRANKE (R.) et KELLER (N.). — Ueber die Wirkungen von Succus Liquiritiae. *Deutsche med. Wschr.*, 1954, 79, 716-719.
127. SHAY (H.), KOMAROV (S. A.), FELS, MERANZE, GRUENSTEIN (M.), SIPLET (H.). — A simple method for the uniform production of gastric ulceration in the rat. *Gastro-Enterology*, 1945, 5, 43-61.
128. SHINODA (J.) et UEEDA (S.). — Ueber das Flavanon-Glucosid in *Glycyrrhiza glabra* L. var. *glandulifera* Regel et Herder. *Ber. deutsch. chem. Gesels.*, 1934, 67 B, 434-440.
129. SIMON (W.), EDWARDS (R. V.). — Glycyrrhiza (Licorice) in the treatment o Psychiatric illness. *J. of clin. exp. Psychopat. Quart. Rev. psych. Neurol.*, 1957, 16, 79-86.
130. SKARZYNSKI (B.). — An oestrogenic substance from plant material. *Nature*, 1933, 131, 766.
131. STEINER (M.) et HOLTZEM (H.). — Triterpene und Triterpen-Saponine. Qualitative Nachweismethoden für Triterpene. In PAECH (K.) et TRACEY (M. V.), *Moderne Methoden der Pflanzenanalyse*, Springer edit., 1955, 3, 64.
132. STRONG (J. A.). — Serum potassium deficiency during treatment with sodium P. A. S. and Liquorice extract. *British med. J.*, 1951, 2, 998-1002.
133. THEOPHRASTE. — *De Historia plantarum*. Lib. XI, Cap. XIII.
134. TOCCO-TOCCO (L.). — Pharmacological researches on the active principle of liquorice. Is the active principle of liquorice a substance of the saponines group. ? *Arch. intern. Pharm. et Thérap.*, 1924, 28, 445-454 et 455-456.
135. TREASE (G. E.). — *A Textbook of Pharmacognosy*. Baillière, Tindall et Cox, édit., 7^e éd., Londres, 1957, 380-388.
136. TSCHIRCH (A.) et CEDERBERG (H.). — Ueber das Glycyrrhizin. *Arch. d. Pharm.*, 1907, 245, 97-111.
137. TSCHIRCH (A.) et GAUCHMANN (X.). — Weitere Untersuchungen über die Glycyrrhizinsäure. *Arch. d. Pharm.*, 1908, 246, 545-565 et 1909, 247, 121-123.
138. VELLUZ (L.). — Action du glycyrrhizate de potassium sur la toxine tétanique. *C. R. Soc. Biol.*, 1932, 111, 354-355.
139. VINCENT (D.). — Etude pharmacologique de la Réglisse (*Glycyrrhiza glabra*). Réglisse et acétylcholine. *Thérapie*, 1951, 6, 448.
140. VINCENT (D.). — Etude pharmacologique de la Réglisse : Réglisse et histamine. *Thérapie*, 1952, 7, 337.
141. VINCENT (D.). — Etude pharmacologique de la Réglisse : Réglisse et ulcère gastrique. *Thérapie*, 1954, 9, 68.
142. VIRATELLE (R.). — Le dosage de la Glycyrrhizine dans les préparations de la Réglisse. *Th. Doct. Univ. (Pharm.)*, Paris, 1938.
143. VOGEL (A.). — Ueber den süßen Stoff aus der Süssholzwurzel (Glycyrrhizin). *J. prakt. Chem.*, 1843, 28, 1.
144. VOLLMER (H.) et WEIDLICH (R.). — Untersuchungen über die diuretische Wirkung der Fructus juniperi, Radix levistici, Radix liquiritiae und Herba violae tricoloris an Kaninchen und Mäusen. *Arch. exp. Pathol. Pharmacol.*, 1937, 186, 574-583.
145. VOSS (W.) KLEIN (P.) et SAUER (H.). — Zur Kenntniss des Glycyrrhizins. *Ber. deutsch. chem. Gesels.*, 1937, 70, 122-132.

- 145 bis. VOSS (W.), KLEIN (P.), SAUER (H.) et PFIRSCHKE (J.). — Zur Kenntniss des Glycyrrhizins. *Z. angew. Chem.*, 1936, 49, 556-557.
146. WALKER (B. S.) et JANNEY (J. C.). — Estrogene substances, apparatus and methods for preparations of stable extracts from natural sources. *Endocrinology*, 1930, 14, 389.
147. WIEST (F.). — Kolorimetrische Bestimmung der Glycyrrhizinsäure als Aglukon. *Th. Doct. Univ. (Pharm.)*, Zurich, 1949.
148. WILSON (C. W.). — A study of the boric acid color reaction of flavone derivatives. *J. am. chem. Soc.*, 1939, 61, 2303-2306.
149. ZIMMERMANN (W.). — Vergleichende Untersuchungen über Succus Liquiritiae. *Apoth. Z.*, 1918, 33, 319, in EDER und SACK, *loc. cit.*

